

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Hämatologie

**Vergleichende Analyse der anti-Bcl-2 Antisense-Oligonukleotide
SPC2996 und Oblimersen in präklinischen Modellen der
chronischen lymphatischen Leukämie**

Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Carola Gigel
aus Essen
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. J. Dürig

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. R. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2013

Publikation:

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde als Vortrag auf der gemeinsamen Jahrestagung der deutschen, österreichischen und schweizerischen Fachgesellschaften für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2010 in Berlin veröffentlicht.

Comparing the pharmacological effects of the novel Locked Nucleic Acid (LNA) modified antisense Bcl-2 inhibitor SPC2996 and G3139 (oblimersen) in preclinical models of chronic lymphocytic leukemia

Gigel, C¹; Eisele, L¹; Möllmann, M¹; Klein-Hitpass, L²; Koch, T³; Hansen, J B R³; Ørum, H³; Wissenbach, M³; Dührsen, U¹; Dürig, J¹

Onkologie 2010; 33 (suppl. 6): 184 V613

¹ Universitätsklinikum Essen, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie, Essen, Deutschland

² Universität Duisburg-Essen, Institut für Zellbiologie, Essen, Deutschland

³ Santaris Pharma A/C, Hørsholm, Dänemark

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Chronische lymphatische Leukämie	7
1.1.1	Definition, Ätiologie und Pathogenese	7
1.1.2	Diagnose, klinische Symptomatik und Prognose	8
1.1.3	Therapie	11
1.2	Bcl-2	13
1.2.1	Molekül	13
1.2.2	Signalweg	14
1.2.3	Rolle von Bcl-2 in der CLL	15
1.3	Antisense-Oligonukleotide	16
1.3.1	Entwicklung	16
1.3.2	Aufbau und Struktur	17
1.3.3	LNA-Modifikation	23
1.3.4	Antisense-Oligonukleotide gegen Bcl-2	25
1.4	Fragestellung der Arbeit	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.3	Substanzen	30
2.1.4	Zelllinien	35
2.1.5	CLL-Zellen	35
2.1.6	NOD/SCID Mäuse	35

2.2	Methoden	36
2.2.1	Zellkultur	36
2.2.2	Inkubation der Zellen	38
2.2.3	NOD/SCID Xenograft Mausmodell	39
2.2.4	Real time PCR.....	40
2.2.5	Western Blot.....	43
2.2.6	Durchflusszytometrie	46
2.2.7	ELISA	49
2.2.8	Assay zur Bestimmung der Adhäsion an Stromazellen	50
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie	51
2.2.10	Auswertung der Daten.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Regulation der Zielstruktur Bcl-2	53
3.1.1	Bcl-2 mRNA-Expression.....	53
3.1.2	Bcl-2 Proteinexpression.....	54
3.1.3	Nachweis der Gymnosis in CLL-Zellen.....	56
3.1.4	Einfluss auf Apoptose und Viabilität	56
3.2	Charakterisierung der Nebeneffekte	60
3.2.1	Ausschüttung von Chemokinen	60
3.2.2	Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche.....	62
3.2.3	Effekte von AODN auf die CLL-Stroma-Zell-Adhäsion	65
3.3	NOD/SCID Xenograft Mausmodell.....	66
4	Diskussion	69
4.1	Regulation der therapeutischen Zielstruktur Bcl-2.....	69
4.2	Charakterisierung der Nebeneffekte	70

4.3	Korrelation der präklinischen Daten mit den Phase-1 Studien	73
4.4	Ausblick.....	74
5	Zusammenfassung.....	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang.....	85
7.1	Übersicht über die verwendeten Patientenproben	85
7.2	Abbildungsverzeichnis	86
7.3	Tabellenverzeichnis	86
7.4	Abkürzungsverzeichnis	87
8	Danksagung.....	90
9	Lebenslauf	91

1 Einleitung

1.1 Chronische lymphatische Leukämie

1.1.1 Definition, Ätiologie und Pathogenese

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zu den malignen Non-Hodgkin-Lymphomen und ist ein B-Zell-Lymphom. Sie ist die am weitesten verbreitete Leukämie des Erwachsenenalters in der westlichen Welt (Morton et al. 2006). Die Inzidenz beträgt in Nordamerika und Europa 3 - 30 Fälle/100.000 Einwohner, mit zunehmendem Alter steigt sie an; das mediane Erkrankungsalter der Patienten beträgt 65 bis 70 Jahre (Redaelli et al. 2004).

Die Ätiologie der CLL ist bislang nicht bekannt, diskutiert werden die Einflüsse von Umweltfaktoren und chronischen Infektionen. Ionisierende Strahlen, Medikamente, Chemikalien und Retroviren haben dagegen keinen Einfluss (Boice et al. 1997). Eine wichtige Rolle scheinen genetische Faktoren zu spielen (Chiorazzi et al. 2005); bei ca. 10 % aller Neuerkrankungen ist eine familiäre Prädisposition nachzuweisen.

B-Vorläuferzellen gelangen als naive, Antigen-unerfahrene B-Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie. Im Keimzentrum des Lymphknotens treten sie mit ihrem Antigen in Kontakt, dabei erkennt der variable Teil des Immunglobulin-Rezeptors das Antigen. Um eine größere Affinität für das Antigen zu erreichen, mutiert der variable Abschnitt des Immunglobulin-Gens. B-Zellen, bei denen durch diesen Vorgang keine größere Affinität zum Antigen resultiert, sterben ab, so dass nach weiteren Mutationen diejenigen B-Zellen übrig bleiben, deren Immunglobulin-Rezeptoren über eine sehr große Affinität zum betreffenden Antigen verfügen. Anschließend erfolgt eine genetische Rekombination, die eine Umstellung der Immunglobulin-Schwerketten-Gene von IgM auf IgG, IgA oder IgE bewirkt; dieser Vorgang wird als Klassenwechsel (engl.: „*class switch*“) bezeichnet. Eine B-Zelle, die eine gegenüber der Keimbahnkonfiguration mutierte Immunglobulin-Gen-Sequenz aufweist, hat daher im Keimzentrum bereits mit ihrem Antigen Kontakt gehabt. Im Gegensatz dazu haben B-Zellen, die keine Mutation ihrer Immunglobulin-Gene aufweisen, im Keimzentrum keinen Antigen-Kontakt gehabt und sind naiv. Der Klassenwechsel der Immunglobulin-Schwerkette wird daher als

Hinweis auf eine erfolgte Keimzentrumspassage betrachtet (Küppers et al. 1999; Küppers 2005; Zenz et al. 2010). Vor diesem Hintergrund können bei der CLL zwei Untergruppen unterschieden werden: eine Gruppe mit mutierten und eine Gruppe mit unmutierten Immunglobulin-Genen. Diese Beobachtung hat zu der Hypothese geführt, dass es in der CLL zwei verschiedene Entitäten gibt, die sich im Reifungsgrad der ursprünglichen B-Zelle unterscheiden: eine Gruppe, deren ursprüngliche B-Zelle eine naive, Antigen-unerfahrene B-Zelle war und eine andere Gruppe, deren ursprüngliche B-Zelle die Keimzentrumspassage bereits durchlaufen hat und somit eine reife, Antigen-erfahrene B-Zelle war (Damle et al. 1999; Hamblin et al. 1999). Man bezeichnet dieses Modell als Zwei-Krankheiten-Modell (engl.: „*two disease model*“). Die Unterscheidung ist auch von klinischer Bedeutung: CLL-Patienten, deren CLL-Zellen unmutierte Immunglobulin-Gene aufweisen, haben eine wesentlich schlechtere Prognose als Patienten mit mutierten Immunglobulin-Genen (Damle et al. 1999).

In einer kürzlich publizierten Arbeit (Seifert et al. 2012) wurden die Genexpressionsmuster verschiedener Subgruppen von B-Zellen gesunder Spender mit denen von CLL-Zellen mit dem Ziel verglichen, die Herkunftspopulation der ursprünglichen B-Zelle zu erforschen. Als wahrscheinlichste Herkunftspopulation gilt eine kleine Untergruppe von B-Zellen, die sowohl CD19- als auch CD5-positiv ist und deren Genexpressionsmuster große Ähnlichkeiten mit dem von CLL-Zellen aufweist. Auch gibt es von dieser Population zwei Untergruppen, die mit den zwei CLL-Entitäten korreliert werden können: Eine Untergruppe ist Antigen-unerfahren, CD27-negativ und hat unmutierte Immunglobulin-Gene, die andere Untergruppe hat die Keimzentrumspassage durchlaufen, ist CD27-positiv und besitzt mutierte Immunglobulin-Gene (Seifert et al. 2012).

1.1.2 Diagnose, klinische Symptomatik und Prognose

Initial verläuft die Erkrankung häufig ohne Symptome. In mehr als der Hälfte der Fälle wird die Diagnose zufällig aufgrund von veränderten Blutwerten im Rahmen von Routineuntersuchungen gestellt (Chiorazzi et al. 2005).

Für die Diagnosestellung gilt eine mehr als drei Monate andauernde Leukozytose mit mehr als 5×10^3 B-Zellen/ μl als eines der wichtigsten Krankheitskriterien einer CLL (Hallek et al. 2008). Zur Abgrenzung von anderen leukämischen B-Non-Hodgkin-Lymphomen wird eine Immunphänotypisierung durchgeführt; dazu wird durchflusszytometrisch die Expression der Antigene CD5, CD19 und CD23 auf den Oberflächen der B-Zellen nachgewiesen. Charakteristisch ist die vergleichsweise schwache Expression von Immunglobulinen und des Antigens CD20. Bei der mikroskopischen Beurteilung des Blutausstrichs fallen charakteristische Zelltrümmer auf, sogenannte Gumprechtsche Kernschatten, die als Artefakte beim Ausstreichen der Blutzellen entstehen und als rupturierte Zellen ohne intakte Zellmembran definiert sind (Johansson et al. 2010).

Klinisch manifestiert sich die Erkrankung zunächst häufig mit einer Lymphknotenschwellung. Die Expansion des malignen Zellklons führt zu einer Knochenmarksinsuffizienz, die sich in Erschöpfungszuständen, Müdigkeit und Abgeschlagenheit äußert. Die Anzahl an Infektionen ist erhöht. Es können sogenannte B-Symptome wie Fieber, Nachtschweiß oder ungewollte Gewichtsabnahme auftreten. Mit zunehmendem Krankheitsverlauf kommt es zu einer Vergrößerung von Leber und Milz. Es können zudem Hauterscheinungen auftreten, wie z. B. Pruritus, chronische Urtikaria, Herpes Zoster, Herpes Simplex, Mykosen oder knotige Hautinfiltrate (Dighiero et al. 2000; Hallek et al. 2008; Zenz et al. 2010).

Die CLL kann einen äußerst heterogenen Verlauf nehmen: Während etwa ein Drittel der Patienten weitgehend ohne Symptome bleibt und niemals eine Behandlung benötigt, folgt bei etwa einem weiteren Drittel auf einen zunächst indolenten Verlauf eine mit der Zeit zunehmende Progression, und bei einem weiteren Drittel nimmt die Erkrankung von Anfang an einen aggressiven Verlauf (Dighiero et al. 2000). Die mittlere Überlebenszeit kann, abhängig vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, zwischen zwei und mehr als zehn Jahren betragen.

Zur Abschätzung der Prognose und der Therapiebedürftigkeit werden die Stadieneinteilungen von Binet et al. und Rai et al. (Rai et al. 1975; Binet et al. 1981) verwendet. Beide Klassifikationen können im klinischen Alltag gut

verwendet werden, da lediglich eine klinische Untersuchung (Palpation der Lymphknotenregionen und der Abdominalorgane) und die Auswertung des Blutbildes für eine Einteilung notwendig sind. Im europäischen Raum hat sich die Klassifikation nach Binet etabliert.

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Rai

Stadium	Definition	Mittlere Überlebenszeit (Monate)
0	Lymphozytose > 30 % Leukämische Zellen im peripheren Blut und/oder Knochenmark	> 120
1	Lymphozytose Vergrößerte Lymphknoten	98
2	Lymphozytose Vergrößerte Lymphknoten und/oder Splenomegalie	84
3	Krankheitsbedingte Anämie (Hb < 11 g/dl), Lymphozytose Vergrößerte Lymphknoten und/oder Splenomegalie und/oder Hepatomegalie	60
4	Anämie und/oder Thrombozytopenie (< 100 x 10 ⁹ /l), Lymphozytose Vergrößerte Lymphknoten und/oder Splenomegalie und/oder Hepatomegalie	< 60

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Binet

Stadium	Definition	Mittlere Überlebenszeit (Monate)
A	Lymphozytose < 3 Lymphknotenregionen vergrößert Hämoglobin > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/μl	> 120
B	Lymphozytose 3 oder mehr Lymphknotenregionen vergrößert Hämoglobin > 10 g/dl Thrombozyten > 100.000/μl	60
C	Hämoglobin < 10 g/dl und/oder Thrombozyten < 100.000/μl	24

Besonders bei Patienten in frühen Stadien der Erkrankung sind die in den Klassifikationen nach Rai und Binet verwendeten Parameter für eine zuverlässige Prognoseabschätzung allerdings nicht ausreichend. Jedoch ist die sichere Bewertung des Progressionsrisikos im Binet-Stadium A eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung besserer Therapiekonzepte (Hallek et al. 2008; Shanafelt et al. 2009).

Zur Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs können verschiedene Prognosefaktoren herangezogen werden, wobei die Ausprägung der Faktoren statistisch mit verschiedenen Krankheitsverläufen korreliert. Trotzdem ist die Prognose für den einzelnen Patienten immer noch schwierig vorherzusagen, da die Überlebenszeiten sehr variabel sind und sowohl von speziellen Faktoren als auch von allgemeinen Prognosefaktoren wie Alter, Diagnosezeitpunkt, Stadium und Therapieansprechen abhängen können (Molica et al. 2001). Weitere Komplikationen wie zum Beispiel Infektionen können die Prognose ebenfalls beeinflussen.

Wichtige prognostische Faktoren neben den allgemeinen Risikofaktoren in der CLL sind bestimmte zytogenetische Faktoren (z. B. ist eine 13q-Deletion mit einer günstigen und eine 11q- oder 17p-Deletion mit einer ungünstigen Prognose assoziiert) (Döhner et al. 2000), bestimmte molekulargenetische Faktoren (prognostisch ungünstig sind z. B. unmutierte Immunglobulin-Schwerketten der B-Zellen (Damle et al. 1999) oder mehr als 20 - 30 prozentige Expression von CD38 (Ibrahim et al. 2001) oder ZAP70 (Wiestner et al. 2003)). Weiterhin sind eine Lymphozytenverdopplungszeit von weniger als 6 Monaten, eine erhöhte Aktivität der Thymidinkinase oder erhöhte β 2-Mikroglobulinkonzentration prognostisch ungünstig (Hallek et al. 2008).

1.1.3 Therapie

Die CLL ist mit Chemotherapeutika bisher nicht heilbar, das Ziel einer Chemotherapie besteht daher in der Reduktion des malignen Zellklons. Die einzige kurative Option stellt derzeit die allogene Stammzelltransplantation dar.

Die Entscheidungskriterien für die Einleitung einer Behandlung wurden zuletzt 2008 vom „*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*“ (IWCLL) (Hallek et al. 2008) auf der Grundlage der Empfehlungen der „*National Cancer Institute Working Group*“ (NCI-WG) (Cheson et al. 1996) von 1996 aktualisiert.

Im Binet Stadium A ist, soweit keine Krankheitssymptome und keine Krankheitsaktivität vorliegen, keine Therapie notwendig. Die Patienten werden in drei – sechs monatlichen Intervallen internistisch-hämatologisch im Hinblick auf ein mögliches behandlungsbedürftiges Fortschreiten der Erkrankung untersucht („*watch and wait*“).

In den Stadien B und C sollte in der Regel eine chemotherapeutische Behandlung erfolgen. Dabei orientiert sich die Therapie am Alter und den Begleiterkrankungen des Patienten; wenn möglich sollte sie im Rahmen einer klinischen Studie erfolgen. In der Erstlinienbehandlung wird vor allem bei jüngeren Patienten eine Kombination des Purinanalogs Fludarabin mit dem Alkylanz Cyclophosphamid und dem gegen CD20 gerichteten Antikörper Rituximab (FCR-Protokoll) eingesetzt. Alternativ können Kombinationen aus Fludarabin und Rituximab (FR) oder aus Rituximab und Bendamustin (BR) zur Anwendung kommen (Hallek 2009). Ein schwerwiegendes Problem stellt die Behandlung von Patienten dar, deren B-Zellen eine Deletion des kurzen Armes des Chromosoms 17 aufweisen, welche eine Dysfunktion des p53 Tumorsuppressorproteins bedingt und mit einer Resistenz gegenüber Fludarabin assoziiert ist (Zenz et al. 2010). Diese Patienten sollten mit dem unabhängig vom p53-Signalweg wirkenden monoklonalen anti-CD52 Antikörper Alemtuzumab behandelt werden; danach sollte nach Möglichkeit eine allogene Stammzelltransplantation erfolgen (Dreger et al. 2007).

Eine Reihe von neuen Substanzen befindet sich in verschiedenen klinischen Phasen in der Testung, wie zum Beispiel Lenalidomid, Flavopiridol, Ofatumumab, Veltuzumab, Obatoclax, Oblimersen, Ibrutinib und andere mehr (Lin 2010; Laurenti et al. 2011; Efremov et al. 2012; Wiestner 2012). Eine Behandlung mit diesen Substanzen findet bisher aber fast ausschließlich nur im Rahmen von klinischen Studien statt.

Ein schwerwiegendes Problem in der CLL ist die Entwicklung von Resistenzen gegen vorhandene Chemotherapeutika (Tsimberidou et al. 2010). Es besteht

daher die Notwendigkeit, neue Arzneimittel zu entwickeln, mit deren Hilfe es gelingt, Resistenzen zu überwinden.

1.2 Bcl-2

1.2.1 Molekül

Das Protein „*B-cell-lymphoma 2*“ (Bcl-2) wurde erstmals beschrieben aufgrund seiner Überexpression infolge einer t(14;18) Translokation beim follikulären Lymphom (Tsujimoto et al. 1984).

Es ist der Prototyp der gleichnamigen Proteinfamilie, die proapoptotische und antiapoptotische Proteine umfasst und die als strukturelle Gemeinsamkeit eine oder mehrere Bcl-2 homologe Domänen (BH-Domänen) besitzen. Die proapoptotischen Mitglieder der Familie wie zum Beispiel „*Bcl-2 associated X protein*“ (Bax) oder „*Bcl-2 homologous antagonist killer*“ (Bak) enthalten die Domänen BH 1 - 3, während die antiapoptotischen Mitglieder wie Bcl-2 selbst, „*B cell lymphoma extra-large*“ (Bcl-XL) oder „*Myeloid cell leukemia sequence*“ (Mcl-1) zusätzlich die BH-4 Domäne enthalten (Yin et al. 1994; Huang et al. 1998).

Eine dritte Gruppe der Familie, die sogenannten Wächterproteine, enthalten nur eine BH-3 Domäne und werden deshalb auch „*BH3-only*“-Proteine genannt. Beispiele hierfür sind „*Bcl-2 interacting killer*“ (Bik) und „*Bcl-2 associated death promotor*“ (Bad). Die Wächterproteine spielen eine modifizierende, in der Regel proapoptotische Rolle, indem sie die Wirkung von Proteinen wie Bax oder Bak verstärken (Willis et al. 2005).

Das Bcl-2-Gen umfasst insgesamt 5105 Nukleotide und enthält 2 Exone. Durch alternatives Splicing im Exon 1 entstehen zwei unterschiedlich lange mRNA-Transkripte, die jeweils für das Bcl-2 alpha (8,5 kb) bzw. beta Protein (5,5 kb) kodieren. Die Bcl-2 alpha und beta Proteine weisen ein Molekulargewicht von 26 bzw. 22 kDa auf und sind strukturell bis auf geringe Unterschiede im Bereich des C-Terminus identisch (Tsujimoto et al. 1986). Bcl-2 ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Hockenbery et al. 1990).

1.2.2 Signalweg

Es gibt zwei verschiedene Wege, durch die eine Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) überführt werden kann: den intrinsischen (mitochondrialen) und den extrinsischen Weg. Beim extrinsischen Weg leitet ein Signal von außerhalb über die Todesrezeptoren der Zelle die Apoptose ein, beim intrinsischen Weg sind es intrazelluläre Signale, z. B. weil die Zelle unter Stress steht, schädlichen Reizen ausgesetzt ist oder keine Signale von außerhalb der Zelle mehr erhält, die für das Überleben der Zelle notwendig sind (Strasser et al. 2000).

Durch ein intrinsisches Signal ausgelöst gelangen Proteine aus der Bcl-2 Familie wie Bax oder Bak in die Mitochondrienmembran und bewirken eine Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Jürgensmeier et al. 1998). Cytochrom C bindet anschließend im Zytoplasma an das Protein „*Apoptose-Protease-activating Faktor 1*“ (Apaf-1) und bewirkt dadurch dessen Polymerisierung. Das Apaf-1 Oligomer wiederum bildet zusammen mit der Procaspase 9 einen heptameren Komplex, das sogenannte Apoptosom, wodurch es zur Abspaltung eines Molekülteils der Procaspase kommt, der dann zur Caspase 9 wird und die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 aktiviert (Acehan et al. 2002). Die Effektorcaspasen spalten nun eine Reihe von Molekülen, die für die Integrität der Zelle wichtig sind und den programmierten Zelltod bewirken.

Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie werden durch Signale aktiviert, die das Überleben der Zelle fördern; das wichtigste Protein ist dabei Bcl-2 selbst. Sie befinden sich in der Mitochondrienmembran und verhindern die Freisetzung von Cytochrom C. Der Mechanismus, über den das geschieht, ist innerhalb der Mitochondrienmembran bislang ebenso wenig gesichert wie derjenige, der die proapoptotischen Signale vermittelt. Abbildung 1 fasst den intrinsischen Weg der Apoptose zusammen.

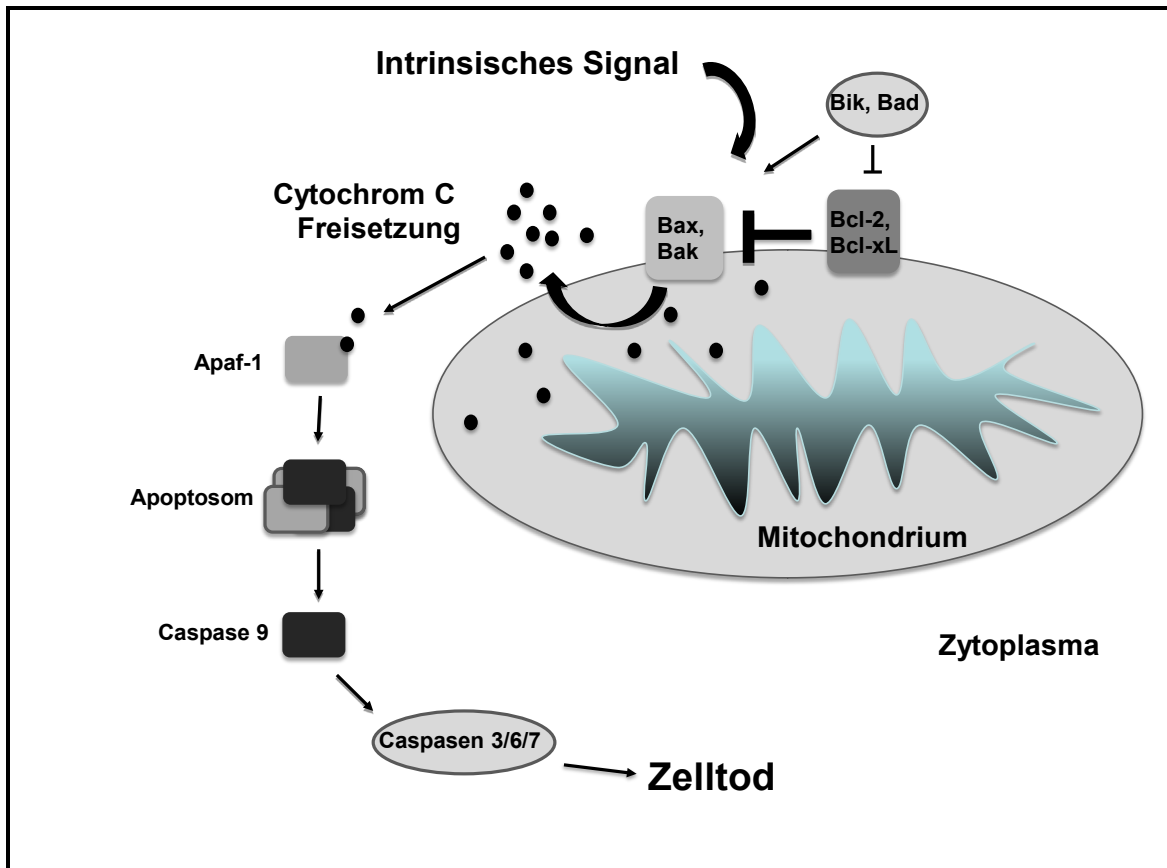


Abbildung 1: Der intrinsische Weg der Apoptose

1.2.3 Rolle von Bcl-2 in der CLL

Im Normalfall halten sich die Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen in der Zelle in einem Gleichgewicht. Im Falle einer Schädigung der Zelle, wenn sie unter Stress steht, schädlichen Reizen ausgesetzt ist oder keine Signale von außerhalb der Zelle mehr erhält, die für das Überleben der Zelle notwendig sind, ist somit eine differenzierte Entscheidung darüber möglich, ob die Zelle weiterleben soll oder nicht. Wenn sich aber das Gleichgewicht zu der Seite der antiapoptotischen Proteine hin verschiebt, hat dies zur Folge, dass die Zelle nicht in die Apoptose übergeht, obwohl sie es aufgrund der intrazellulären Signale eigentlich sollte. Dies führt in der Konsequenz zu einer Anreicherung von geschädigten und gegebenenfalls nicht mehr funktionstüchtigen Zellen. In vielen Tumoren ist dies der Fall.

Bcl-2 wird in 70 - 80 % der CLL-Fälle überexprimiert (Hanada et al. 1993). Die intrazellulär erhöhte Bcl-2 Proteinkonzentration scheint eine Rolle bei der

Resistenzentwicklung gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika zu spielen (Pepper et al. 1999). Aufgrund dessen ist die Inhibition von Bcl-2 und damit eine Normalisierung der Regulation der Apoptose sinnvoll für die Therapie der CLL. Es gibt mehrere Möglichkeiten, Bcl-2 als therapeutisches Zielmolekül anzugreifen: mit niedermolekularen Verbindungen wie z. B. Obatoclax (O'Brien et al. 2009), die direkt an das Bcl-2 Protein binden und dieses inhibieren oder, wie im Folgenden beschrieben, mit Antisense-Oligonukleotiden, die die Translation des Bcl-2 Proteins verhindern.

1.3 Antisense-Oligonukleotide

1.3.1 Entwicklung

Antisense-Oligonukleotide (AODN) sind kleine, einzelsträngige Nukleotidsequenzen, die komplementär zur mRNA eines Proteins sind und mit dem Ziel appliziert werden, das entsprechende Protein herabzuregulieren.

1977 entwickelten Paterson et al. die Idee, dass mit einzelsträngigen Nukleotidsequenzen komplementäre mRNA inhibiert werden kann (Paterson et al. 1977); dies geschah noch in einem zellfreien System. Ein Jahr später konnten Stephenson et al. zeigen, dass das Prinzip auch innerhalb von Zellen funktioniert (Stephenson et al. 1978). In den achtziger Jahren wurde ein endogener posttranskriptioneller Regulierungsmechanismus entdeckt, die RNA-Interferenz (RNAi) (Mizuno et al. 1984).

RNAi bedeutet, dass kleine Bausteine aus Ribonukleinsäure mit mRNA in Wechselwirkung treten. Das führt dazu, dass das Protein, für die die mRNA kodiert, nicht translatiert werden kann. Diese Bausteine heißen „*small interfering RNA*“ (siRNA) und „*micro RNA*“ (miRNA); inzwischen kennt man auch einen dritten Baustein, „*piwi-interacting RNA*“ (piRNA).

siRNA wird als Verteidigungsmechanismus gegen RNA-Viren aus Partikeln derselben während ihrer Replikation in der Wirtszelle gebildet. miRNA sind kleine zelleigene RNA-Transkripte, die komplementär zur mRNA des zu modifizierenden Gens sind und an anderer Stelle im Genom transkribiert werden (Hannon 2002). Sowohl siRNA als auch miRNA bilden charakteristische, doppelsträngige

Strukturen und werden durch die Enzyme Dicer bzw. Drosha in kleinere Teile zerschnitten (Bernstein et al. 2001), so dass doppelsträngige RNA Moleküle mit einer mittleren Länge von 20 - 22 Basenpaaren entstehen. Die Enzyme im Enzymkomplex „*RNA induced silencing complex*“ (RISC), die sogenannten Argonauten, zerschneiden den Doppelstrang. Einer der Einzelstränge dient als Führungsstrang, an den anschließend die komplementäre mRNA bindet. Den resultierenden RNA-RNA Doppelstrang baut das Enzym Argonaut 2 (Ago2) ab und verhindert damit die Translation des Proteins (Liu et al. 2004).

Das Enzym Ago 2 besitzt eine katalytische Domäne, die analog zu derjenigen der RNase H aufgebaut ist (Liu et al. 2004). Die RNase H ist eine Ribonuklease, die RNA-DNA Duplexe spaltet (Chapados et al. 2001).

Bei der Entwicklung der AODN hatte man somit physiologische Systeme als Vorbild und konnte bereits vorhandene, natürliche Abbaumechanismen für RNA-RNA- bzw. RNA-DNA-Duplexe nutzen.

1.3.2 Aufbau und Struktur

Bei der Entwicklung von AODN müssen verschiedene Anforderungen miteinander vereint werden: Die Moleküle müssen löslich sein, applizierbar mit oder im günstigsten Fall ohne Transfektionshilfsmittel, sie müssen problemlos von den Zellen aufgenommen werden, nukleasestabil sein, so wenig Nebeneffekte wie möglich verursachen, dabei eine hinreichend große Affinität und Selektivität zur Ziel-mRNA aufweisen und es muss für die gebildeten Duplexe einen effektiven Abbaumechanismus geben.

Die Grundstruktur besteht, wie in jedem Nukleotid, aus einer Base, einem Zucker und einer Phosphatgruppe. Zucker und Phosphat sind glykosidisch miteinander verknüpft und bilden wie in natürlichen Nukleinsäuren das Grundgerüst. Sie liegen in der Regel anionisch geladen als Salze vor, was trotz einer Molekülgröße von bis zu 25 Nukleotiden eine ausreichende Löslichkeit gewährleistet (White et al. 1996). Nach parenteraler Gabe liegen sie im Blut gebunden an die hydrophilen Seiten von Plasmaproteinen vor, was sie vor einer schnellen renalen Filtration bewahrt (Brown et al. 1994).

In mehreren Veröffentlichungen wird erwähnt, dass AODN nur mit Transfektionshilfsmitteln appliziert werden können, um eine ausreichende Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten (Capaccioli et al. 1993; Jahrsdörfer et al. 2002). Dies hat zu der Entwicklung zahlreicher Transfektionshilfsmittel geführt, u. a. Liposomen, kationische Lipide, Nanopartikel oder Peptide (Mansoor et al. 2008). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit hingegen konnte gezeigt werden, dass AODN auch ohne Transfektionshilfsmittel appliziert werden können und trotzdem effektiv in die Zellen aufgenommen werden (Stein et al. 2009). Dies wird als nackte Transfektion (engl: „*naked transfection*“ oder „*gymnosis*“) bezeichnet. Der Mechanismus des Transportes in die Zellen ist noch nicht vollständig geklärt; in früheren Veröffentlichungen ist man davon ausgegangen, dass AODN über Pinozytose in die Zelle gelangen (Stein et al. 1993). Im Augenblick wird als wahrscheinlich angesehen, dass am Durchgang der AODN durch die Zellmembran Proteine mit Transporterfunktion beteiligt sind (Lendvai et al. 2009). In den Zellen liegen sie ebenfalls gebunden an Proteine vor und werden in die Endolysosomen transportiert (Shoji et al. 1991). Erst bei einem Überschuss liegen sie, gebunden an Proteine, im Zytoplasma vor und haben die Möglichkeit, zu ihrer Ziel-mRNA zu gelangen.

Eine Grundvoraussetzung für die Applikation von Nukleotiden ist es, den raschen Abbau durch unspezifische Nukleasen zu verhindern. In dem man einen Sauerstoff im Phosphat substituiert, erreicht man eine Resistenz gegenüber Nukleasen; das war das primäre Ziel bei der Entwicklung der AODN der ersten Generation. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Substitution mit einem Schwefelatom, also ein Phosphorothioat, am effektivsten ist (Stein et al. 1988). Die meisten AODN, die heute im Einsatz sind, haben ein Phosphorothioat-Grundgerüst.

Bei den AODN der zweiten und dritten Generation wurde versucht, durch Modifikationen des Zuckerteils sowohl die Affinität zur Zielstruktur zu erhöhen als auch eventuelle Nebeneffekte (s. u.) zu verringern (Mansoor et al. 2008). Der Zuckerteil eines AODN kann (soweit als Struktur noch intakt) entweder eine Ribose oder eine Desoxyribose sein; je nach Zucker handelt es sich bei dem Molekül dann rein formal um ein RNA- oder ein DNA-Nukleotid.

Sowohl die Ribose als auch die Desoxyribose können theoretisch in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: in der C2'endo- oder der C3'endo Konformation (*endo* bedeutet, der jeweilige Kohlenstoff ragt aus der Ebene heraus nach oben; unter *exo* versteht man, er ragt aus der Ebene heraus nach unten) (Brameld et al. 1999).

In physiologisch vorkommender RNA liegt die Ribose immer in der C3'endo Konformation vor, im Gegensatz zur DNA, in der die Desoxyribose die C2'endo-Konformation bevorzugt, grundsätzlich aber verschiedene Konformationen annehmen kann (Brameld et al. 1999). Dies hat unmittelbare Auswirkungen auf die Faltung der beiden Nukleotidstränge: natürliche RNA liegt bei physiologischem pH-Wert als A-Form Helix vor, während DNA als B-Form Helix vorliegt (Franklin et al. 1953; Watson et al. 1953; Basham et al. 1995). Physiologische RNA und DNA unterscheiden sich also nicht nur durch den Zucker an sich, sondern auch durch ihre räumliche Struktur.

Durch Modifikationen am Zuckerteil der AODN kann man nicht nur die Struktur des Zuckers, sondern auch die räumliche Struktur des ganzen Moleküls verändern und zielgerichtet die Affinität sowohl zur therapeutischen Zielstruktur als auch zu beteiligten Rezeptoren wie dem Toll-like-Rezeptor-9 (siehe Kapitel 4.2.) und Enzymen wie der RNase H (siehe Kapitel 1.3.1) beeinflussen.

Zur Verhinderung der Translation des Proteins kommen verschiedene Mechanismen in Frage: Direkter Abbau des AODN-mRNA Duplexes entweder durch die RNase H, durch den Enzymkomplex RISC oder durch Blockade der Ziel-mRNA ohne nachfolgenden Abbau. Als effektivste Methode hat sich dabei der Abbau über die RNase H erwiesen (Crooke 1999; Wu et al. 2004). Wie oben bereits erwähnt schneidet die RNase H RNA-DNA-Duplexe; für einen effektiven Abbau über diesen Mechanismus muss das AODN wenigstens in Teilen als DNA vorliegen bzw. als solche erkannt werden. Es wurden daher verschiedene Kombinationen von RNA-DNA Oligonukleotiden entwickelt: „*Mixmers*“, „*Gapmers*“, „*Headmers*“ oder „*Tailmers*“, je nach Position des modifizierten Teils (gemischt, in der Mitte, am Anfang, am Ende des Oligonukleotids). Diese Kombinationen sollen beide Eigenschaften miteinander vereinen, hohe Affinität zur therapeutischen Zielstruktur mit dem Abbau über die RNase H. Wenn das AODN als „*Gapmer*“ vorliegt, mit mindestens sieben - acht DNA-basierten Einheiten in der Mitte, sind

beide Bedingungen am besten erfüllt (Kurreck et al. 2002). Tabelle 3 fasst Anforderungen an die Struktur von AODN und Möglichkeiten der Modifikation zusammen.

Tabelle 3: Möglichkeiten der Modifikation von AODN

Anforderung	Möglichkeiten der Modifikation
Löslichkeit	Ladung, Molekülgröße
Transfektion	Gymnosis, Liposomen, kationische Lipide, Nanopartikel
Aufnahme in Zellen	Größe, Bindungskapazität an Proteine (Sequenz)
Nukleasestabilität	Veränderungen der Phosphatgruppe
Affinität zur Ziel-mRNA	Sequenz, Faltung (Konformation des Zuckers)
Nebeneffekte (TLR-9)	Sequenz, Faltung (Konformation des Zuckers)
Abbau über RNase H	Mindestens sieben Nukleotide DNA (B-Helix)
Abbau über RISC	RNA Nukleotide (A-Helix)

Abbildung 2 zeigt schematisch den Weg der AODN in eine Zelle und die verschiedenen Möglichkeiten der Bindung an die Zielstruktur, des Abbaus sowie mögliche Nebeneffekte:

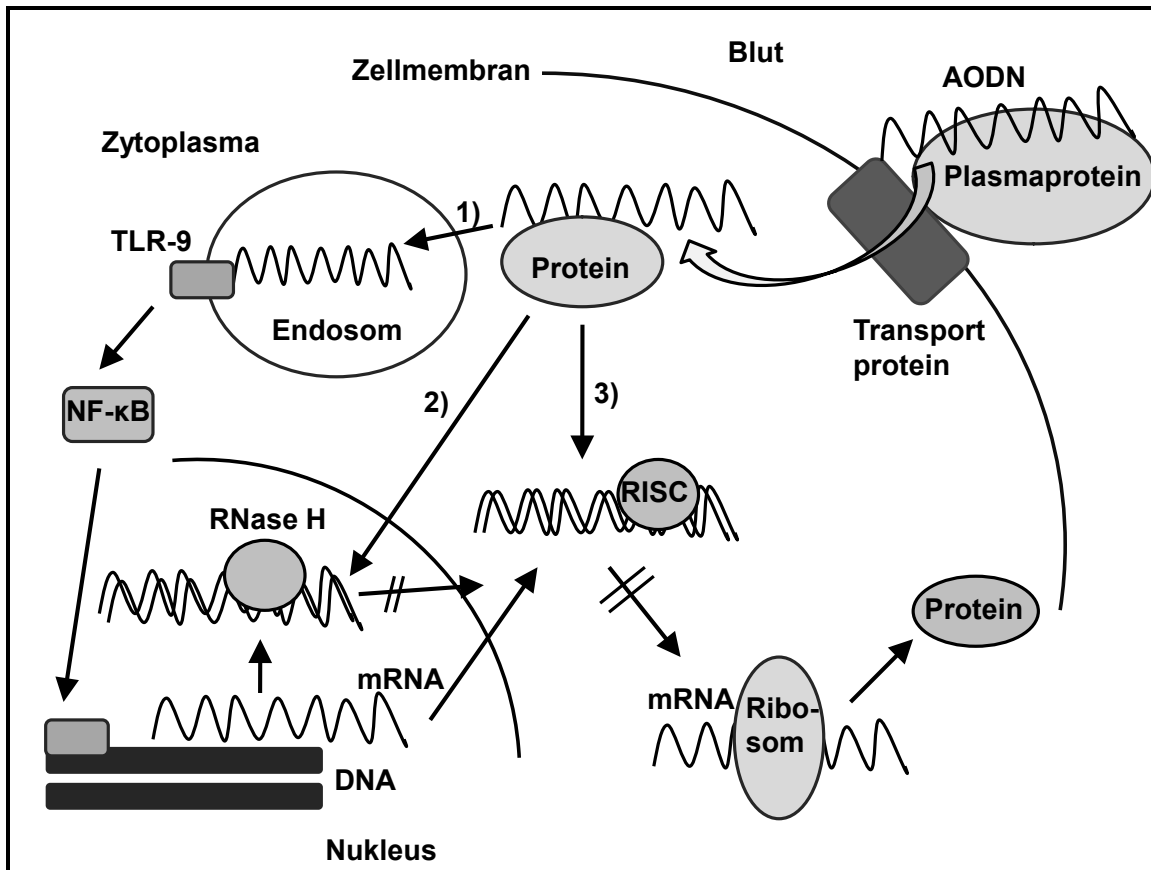


Abbildung 2: Wege eines AODN in einer Zelle

Ein AODN wird intravenös appliziert und liegt im Blut gebunden an ein Plasmaprotein vor. Mit Hilfe eines Transportproteins in der Zellmembran gelangt es in die Zelle und wird dort wiederum an ein Protein gebunden. Von dort aus wird es in die Endosomen gebracht und abgebaut (1); unter Umständen aktiviert es dort den Toll-like-Rezeptor-9. Bei einem Überschuss kann das AODN seine Ziel-mRNA entweder im Zellkern binden (2) und mit Hilfe der RNase H zersetzen oder vor der Translation abfangen und mittels des Enzymkomplexes RISC abbauen (3). Welchen Weg das AODN einschlägt hängt von der Art der Zelle, der Struktur des Zuckers, der Konformation, der Sequenz und der Größe des Moleküls ab (s. o.).

Das Ziel, möglichst viele dieser Forderungen zu erfüllen, hat in den letzten Jahren zur Entwicklung verschiedenster Modifikationen der natürlichen Nukleinsäuren geführt.

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Modifikationen.

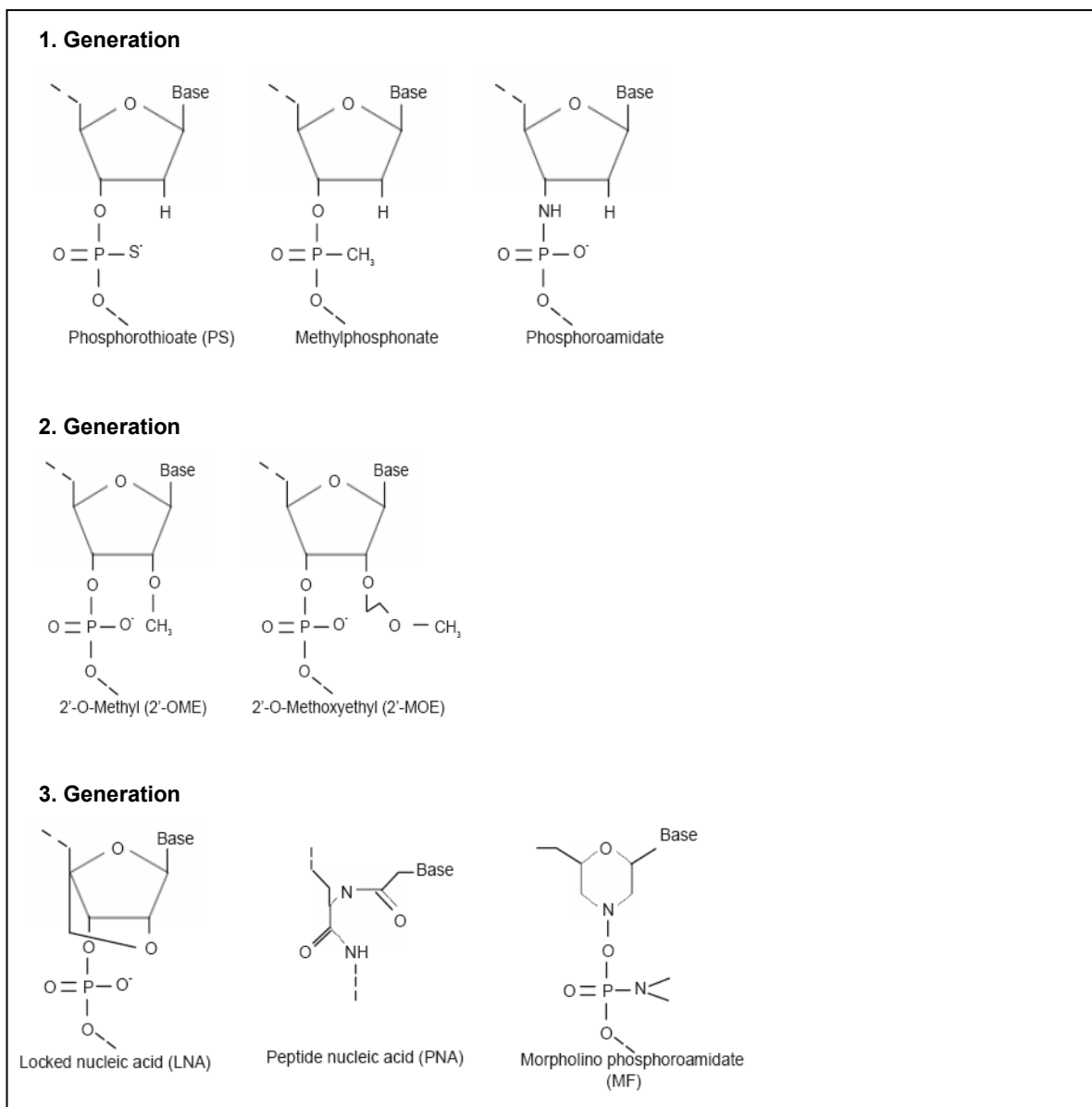


Abbildung 3: Modifikationen von AODN

Die erste Generation der AODN (Phosphorothioate, Methylphosphonate, Phosphoroamidate) weist Modifikationen im Phosphatteil auf. Das Ziel dieser Modifikationen war es, die Moleküle nukleaseresistent zu machen.

In der zweiten Generation (2'-O-Methyl-AODN bzw. 2'-O-Methoxyethyl-AODN) war das Ziel, die Affinität zur therapeutischen Zielstruktur zu erhöhen. Dazu wurde die C2-OH Gruppe verethert und das Molekül dadurch lipophiler.

In der dritten Generation (Locked nucleic acids, Peptide nucleic acids, Morpholino Phosphoroamidate) schließlich wurde die Zuckerstruktur (zum Teil stark) verändert, ebenfalls mit dem Ziel, die Affinität zur therapeutischen Zielstruktur zu erhöhen (Mansoor et al. 2008).

1.3.3 LNA-Modifikation

LNA ist die Abkürzung für „*Locked nucleic acid*“ und bedeutet, dass in ein Nukleotid eine 2'-O,4'-C-methylene-β-D-ribofuranosyl-Einheit anstelle der normalen Ribose als Zucker eingebaut worden ist. Erstmals beschrieben wurde diese Modifikation unabhängig voneinander von zwei Gruppen (Singh et al. 1998; Obika et al. 2000). LNAs gehören zur dritten Generation von AODN.

Abbildung 4 zeigt die Strukturformel eines LNA-modifizierten AODN.

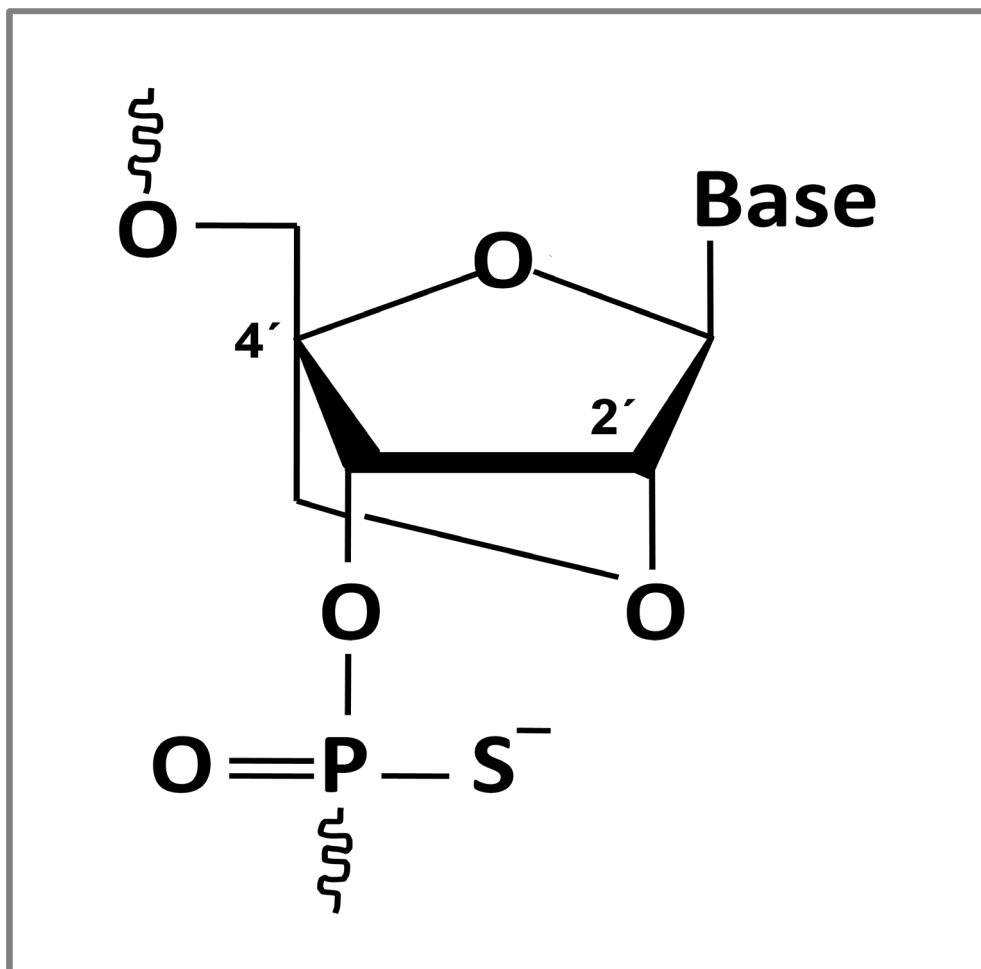


Abbildung 4: LNA-modifiziertes AODN in der Haworth-Formel

Modifiziert nach (Mansoor et al. 2008)

Durch die Einführung der 2'-O,4'-C-methylene-β-D-ribofuranosyl-Einheit wird das Nukleotid in der 3'endo Konformation festgehalten (engl: „*locked*“) und kann nicht mehr zwischen den verschiedenen Konformationen wechseln (Obika et al. 1997; Obika et al. 1998). Das Molekül sieht also sterisch gesehen aus wie eine RNA, im

Gegensatz zu anderen Nukleotiden ohne LNA, in denen die Ribose auch in der C2'endo Konformation vorliegen kann und somit sterisch einer DNA ähnelt. Zur besseren Übersicht zeigt Abbildung 5 den Zuckerteil eines LNA-AODN in der Sesselkonfiguration.

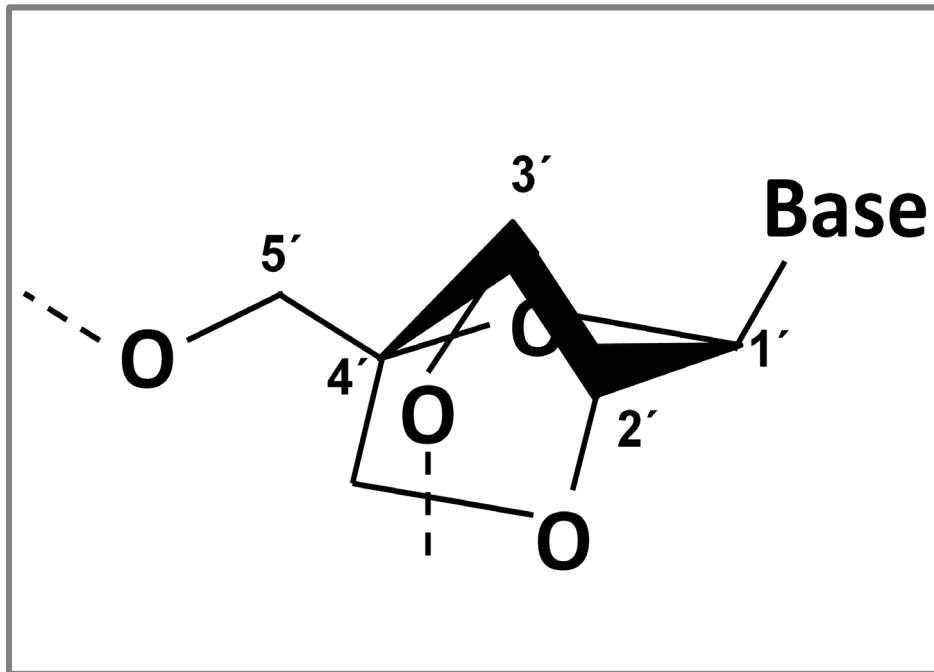


Abbildung 5: Zuckerteil eines LNA-Oligonukleotids in der Sessel-Konfiguration

In dieser Darstellung ist die räumliche Anordnung des Moleküls besser zu erkennen. Der hier abgebildete Zucker liegt in der C3'endo Konformation vor, das C2 liegt mit dem C1 und dem C4 sowie dem Halbacetal-Sauerstoff in einer Ebene. Modifiziert nach (Petersen et al. 2000)

Dies hat zwei Vorteile:

- LNA modifizierte AODN haben eine wesentlich größere Affinität zu mRNA als andere Nukleotide: LNA:RNA Hybride liegen in physiologischer A-Helix Form vor (Petersen et al. 2000; Petersen et al. 2002).
- LNA modifizierte AODN bewirken weniger Toll-like-Rezeptor-9-vermittelte Nebeneffekte (siehe Kapitel 4.2), da dieser einzelsträngige DNA-Moleküle erkennt und die LNAs im Gegensatz zu anderen Nukleotiden auch sterisch nicht wie eine DNA aussehen (Vollmer et al. 2004).

1.3.4 Antisense-Oligonukleotide gegen Bcl-2

1.3.4.1 Oblimersen

Seit 1993 hat es Versuche gegeben, die Bcl-2 mRNA als therapeutische Zielstruktur für AODN zu verwenden (Kitada et al. 1993). Erste klinische Versuche mit Patienten mit Bcl-2 positivem Non-Hodgkin Lymphom wurden mit Oblimersen (G3139) der Firma Genta durchgeführt (Waters et al. 2000). Oligmersen ist das erste AODN, das als therapeutische Zielstruktur die ersten 6 Codons des offenen Leserahmens (engl.: „*open reading frame*“) der Bcl-2 mRNA hat. Es ist 18 Basen lang, alle Nukleotide haben ein Phosphorothioat-Grundgerüst. Die Sequenz ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Oligomer	Ziel- struktur	Sequenz	Länge (mer)
SPC2996	Bcl-2	5'- ^m C _s T _s C _s C _s C _s a _s a _s c_sg_st_sg_sc_sg_s ^m C _s ^m C _s a-3'	16
SPC280-7 (Oblimersen)	Bcl-2	5'-t _s C _s t _s C _s C _s C _s a _s g _s c_sg_st_sg_sc_sg_s C _s C _s a _s t-3'	18
SPC4077	none	5'-T _s C _s A _s a _s ^m C _s A _s T _s t _s a _s G _s A _s ^m C _s t _s ^m C _s t _s T _s A-3'	17
ODN2216	TLR-9	5'-g _s g _s gggac g_sg_sg_sg_sg_sg_sg_sg_sg_s -3'	20

Ein kleingestelltes „s“ bedeutet, dass dieser Baustein ein Phosphorothioat trägt. Großbuchstaben bedeuten, dass der Baustein ein LNA ist. Fett gedruckt sind sich wiederholende CGs (CpG Motive, siehe 4.2). Ein hochgestelltes m bedeutet, dass das jeweilige Cytosin methyliert ist. Zu erkennen ist, dass SPC280-7 insgesamt 2 Basen länger ist als SPC2996 und beide bis auf eine Base sequenzgleich sind. SPC280-7 ist ein Produkt der Firma Santaris, das in Aufbau, Sequenz und Modifikation Oblimersen der Firma Genta entspricht (Klasa et al. 2002).

Oblimersen trägt 2 CpG-Motive in seiner Sequenz (in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben). Diese Motive sind, wie in der Diskussion (Kapitel 4.2) ausführlich erläutert, Erkennungsmotive für den Toll-like-Rezeptor-9. In verschiedenen Arbeiten, auch an CLL-Zellen, konnte in vitro gezeigt werden, dass Oblimersen ein Agonist für den Toll-like-Rezeptor-9 ist (Jahrsdörfer et al. 2002).

Für Oblimersen wurde bereits 2005 in einer Phase-1 Studie ein antileukämischer Effekt an CLL Patienten beschrieben (O'Brien et al. 2005); gegenwärtig befindet es sich in der klinischen Phase 3 (O'Brien et al. 2007; O'Brien et al. 2009).

1.3.4.2 SPC2996

„*Santaris Pharma Compound 2996*“ (SPC2996) ist ein AODN der Firma Santaris, das als therapeutische Zielstruktur ebenfalls die ersten 6 Codons des offenen Leserahmens der Bcl-2 mRNA hat. Es ist 16 Basen lang, bis auf eine Base sequenzgleich mit Oblimersen und besitzt ebenfalls zwei CpG-Motive. Im Unterschied zu diesem verfügt SPC2996 über insgesamt vier LNA modifizierte Basen, jeweils zwei an jedem Ende der Sequenz; es ist also ein „*Gapmer*“. Die Sequenz ist in Tabelle 4 dargestellt.

Wie Oblimersen kann auch SPC2996 ohne Hilfe von Transfektionshilfsmitteln appliziert werden. In verschiedenen Zelllinien wie z. B. der 518 Melanom Zelllinie konnte eine effektive Herabregulation von Bcl-2-mRNA und -Protein mittels dieser Methode nachgewiesen werden (Stein et al. 2009).

SPC2996 ist ebenfalls bereits in einer Phase-1 Studie an CLL Patienten untersucht worden (Dürig et al. 2011): 18 CLL-Patienten erhielten maximal 6 Dosen SPC2996 i.v. in verschiedenen Konzentrationen (0,2 – 6 mg/kg Körpergewicht). Mittels Genexpressionsanalyse wurde zusätzlich die transkriptionelle Aktivität in den CLL-Zellen der Patienten vor und nach der Applikation von SPC2996 miteinander verglichen.

Bei 30 % der Patienten kam es dosisabhängig zu einer Reduktion der zirkulierenden CLL-Zellen um mehr als 50 %. Allerdings wurde in keinem Patienten ein dauerhaftes klinisches Ansprechen auf die Therapie erreicht. In 7 Fällen kam es zu klinisch bedeutsamen Nebenwirkungen: Entzündungsreaktionen, die sich dosisabhängig in Fieber und schmerzhafter Lymphadenopathie äußerten. Ähnliche Ergebnisse hat auch die Phase-1 Studie von Oblimersen ergeben (O'Brien et al. 2005).

In der Genexpressionsanalyse zeigte sich, dass 24 Stunden nach der SPC2996-Infusion 466 Gene differentiell reguliert worden waren. Diese Gene ließen sich funktionell vorwiegend den Bereichen Zell-Aktivierung, Toll-like-Rezeptor-

Signalwege und Immunantwort zuordnen. Selbst in der Hochdosisgruppe gab es allerdings keine Beeinflussung des primären Endpunktes der Studie, der Bcl-2 mRNA-Expression.

In einem zweiten Teil der Arbeit konnten die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen auf der Proteinebene bestätigt werden: Die Messung der Toll-like-Rezeptor-Signal-Moleküle MIP1- α (CCL3), TNF- α und CCL2 aus dem Überstand der Zellen sowohl mittels einer Luminex-Plattform als auch mittels ELISA ergab eine signifikante Zunahme der Proteinkonzentrationen nach der Infusion mit SPC2996. Alle beobachteten Effekte waren reversibel (Dürig et al. 2011).

Bislang gibt es noch keine veröffentlichten Arbeiten, in denen in vitro an isolierten CLL-Zellen untersucht worden ist, ob die beobachteten antileukämischen Effekte von SPC2996 oder Oblimersen auf einer Beeinflussung der Bcl-2 Expression und/oder auf anderen Mechanismen beruhen (Jahrsdörfer et al. 2002).

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit basiert auf den oben erwähnten Veröffentlichungen von Dürig et al., O'Brien et al. und Stein et al. und untersucht, welche Effekte SPC2996 im Vergleich mit Oblimersen in einer lymphatischen Zelllinie und in CLL-Zellen in vitro und in einem NOD/SCID Mausmodell zeigt und in wieweit diese die klinischen Ergebnisse der Phase-1 Studien erklären können.

Im Einzelnen sollen dabei die folgenden drei Fragen beantwortet werden:

1. Regulieren SPC2996 und Oblimersen ihr therapeutisches Zielmolekül, die Bcl-2 mRNA, in vitro?
2. Welche Nebeneffekte zeigen sich auf zellulärer Ebene? Können diese mit den klinischen Beobachtungen korreliert werden?
3. Welche Erklärung gibt es auf zellulärer Ebene für die klinisch beobachtete Reduktion der CLL-Zellen im peripheren Blut von mit Anti-Bcl-2 AODN therapierten Patienten?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav: Systec D-65	Systec, Wettenberg
Cytospin: Cytospin 2	Shandon, Thermo Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer: BD™ LSRII	Becton Dickinson, San Jose, USA
Elektrophorese: XCell Sure Lock™, Novex Mini-cell	Invitrogen, Karlsruhe
ELISA Reader: MRX	Dynatech Laboratories, Chantilly, USA
Fluoreszenzmikroskop: Olympus BX 50	Olympus, Tokio, Japan
Fotokassette	Amersham, GE Healthcare, Freiburg
Inkubator	Forma, Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskope: <ul style="list-style-type: none"> • Invert-Mikroskop Diavert • Lichtmikroskop 	<ul style="list-style-type: none"> • Leitz (Leica), Wetzlar • Zeiss, Jena
Nass-Blot System: XCell II™ Blot Module	Invitrogen, Karlsruhe
Photometer: Eppendorf Bio, Photometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Rüttelschüttler: Vv3	VWR, Darmstadt
Schüttler: Unimax1010	Heidolph, Schwalbach
Sicherheitswerkbank: KL2, NV440-400E	Nu Aire, Plymouth, USA
Stromgeber: Power Pac 200	BioRad, München
Taumel-Rüttelschüttler: RM5	Karl Hecht, Sondheim
Thermocycler: TGradient	Biometra, Göttingen

Gerät	Hersteller
Thermomixer: Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Waagen: EW 4200-2NM, ALJ 220-4NM	Kern, Balingen
Zentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge 5415R • Allegra 6KR Centrifuge • Rotanta 460R 	<ul style="list-style-type: none"> • Eppendorf, Hamburg • Beckmann Coulter, Fullerton, USA • Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, San Jose, USA
Fertiggele: NuPAGE 4 – 12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen, Karlsruhe
Filme: Amersham Hyperfilm	GE Healthcare, Freiburg
Filter (40 und 100 µm)	BD Biosciences, San Jose, USA
Flachbodenplatte (6er, 96er)	BD Biosciences, San Jose, USA
Injektionsnadeln	BD Biosciences, San Jose, USA
Kapillarpipette	Hirschmann, Eberstadt
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reagiergefäße: <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml • 15 ml, 50 ml: Falcon 	<ul style="list-style-type: none"> • Star Lab, Ahrensburg • BD Biosciences, San Jose, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen: Tip One	Star Lab, Ahrensburg
Ep Tips	Eppendorf, Hamburg
Pipettoren (elektronisch)	Hirschmann, Eberstadt

Material	Hersteller
PVDF Membran	Invitrogen, Karlsruhe
Serologische Pipetten	BD Biosciences, San Jose, USA
Whatman Filter	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturflaschen: 250 ml, 650 ml	Cell Star, Greiner Bio-one, Frickenhausen

2.1.3 Substanzen

2.1.3.1 Chemische Substanzen

Tabelle 7: Liste der verwendeten chemischen Substanzen

Substanz	Hersteller
Aquadest (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Desoxycholsäure	Sigma, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, St. Louis, USA
ECL (Enhanced Chemiluminescence): Amersham™ ECL Plus	GE Healthcare, Freiburg
Entwicklerlösung: Röntgen-entwicklerkonzentrat	Adefo Chemie, Dietzenbach
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Na)	Sigma, St. Louis, USA
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, San Jose, USA
Ficoll Lymphoprep	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Fixiererlösung: Röntgenfixierkonzentrat	Adefo Chemie, Dietzenbach
Fludarabin (Fludara®)	Medac, Wedel

Substanz	Hersteller
Foetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, A
Hydroxyethylpiperazinethyl-sulfonat-Natrium (HEPES-Na)	Sigma, St. Louis, USA
LysoTracker[®]Red DND-99	Invitrogen, Karlsruhe
Isofluran	Abbot, Abbot Park, USA
Isopropanol	Sigma, St. Louis, USA
Mercaptoethanol	BioRad, München
Methanol	Sigma, St. Louis, USA
Milchpulver	AppliChem, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	CabioChem, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma, St. Louis, USA
Natriumpyrophosphat (NaPP)	Sigma, St. Louis, USA
Rituximab (MabThera[®])	Hoffmann La Roche, Basel, CH
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
Phosphat buffered saline (D-PBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Platinum Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Proteaseinhibitor: Roche complete mini	Hoffmann La Roche, Basel, CH
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Standard: See Blue Plus 2[™]	Invitrogen, Karlsruhe
Terralin liquid	Schülke, Norderstedt
Türks-Lösung	Merck, Darmstadt
Triton X 100	Sigma, St. Louis, USA

Substanz	Hersteller
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin-Lösung 0,25 %	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	BioRad, München

2.1.3.2 Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Beladungspuffer	<ul style="list-style-type: none"> • Roti Load™ (Carl Roth, Karlsruhe)
Erythrozyten-Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • Pharm Lyse™ (BD Biosciences, San Jose, USA)
FACS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 % Natriumazid in PBS
Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 ml NP® MES SDS Running Buffer 20x • 950 ml Ampuwa
Lysepuffer für Western Blot	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM HEPES pH 7,3 • 0,1 % SDS • 0,5 % Desoxycholsäure • 1 % Triton X 100 • 10 mM Na-EDTA • 10 mM NaPP • 10 mM NaF • 125 mM NaCl • Ampuwa
Milch-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Milchpulver in PBS-T-Lösung
PBS-T-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05 % Tween 20 in PBS
RNA-Lysepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1 % Mercaptoethanol in RLT-Puffer aus Qiagen RNeasy® Mini Kit
Transfer-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 ml NP® Transfer Buffer 20x • 50 ml Methanol • 950 ml Ampuwa

2.1.3.3 Antikörper für Durchflusszytometrie

Tabelle 9: Liste der verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper	Hersteller
Annexin-V FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD5 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD19 PC-5	Beckmann Coulter, Brea, USA
CD20 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
CD40 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45 APC	BD Biosciences, San Jose, USA
DAPI	Sigma, St. Louis, USA

2.1.3.4 Antikörper für Western Blot

Tabelle 10: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot

Antikörper	Hersteller
β-Aktin (rabbit, anti-human)	Cell Signaling, Danvers, USA
Bcl-2 (mouse, anti-human)	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-mouse IgG	GE Healthcare, Freiburg
Anti-rabbit IgG	Cell Signaling, Danvers, USA

2.1.3.5 Antisense-Oligonukleotide

Tabelle 11: Liste der verwendeten Antisense-Oligonukleotide

Oligonukleotid	Hersteller
Santaris Pharma Compound 2996	Santaris Pharma, Hørsholm, DK
Santaris Pharma Compound 2996FAM	Santaris Pharma, Hørsholm, DK
Santaris Pharma Compound 280-7	Santaris Pharma, Hørsholm, DK
Santaris Pharma Compound 4077	Santaris Pharma, Hørsholm, DK
ODN 2216 (TLR $grade^{TM}$)	Axxora, Lörrach

2.1.3.6 Kits

Tabelle 12: Liste der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
Advantage® RT-for-PCR Kit	Clon Tech, Mountain View, USA
BCA™ Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Quantikine® Human CCL3/MIP-1α	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine® Human TNF-α/TNFSF1A	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden

2.1.3.7 Medien

Tabelle 13: Liste der verwendeten Medien

Medium	Hersteller
RPMI-Medium 1640	Gibco®, Carlsbad, USA
IMDM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
HS5-konditioniertes Medium	IMDM-Medium, in dem HS5-Zellen kultiviert worden sind

2.1.4 Zelllinien

Als lymphatische Zelllinie wurden MEC-1 Zellen verwendet. Die Zellen dieser Zelllinie wurden 1993 einem Patienten mit B-CLL entnommen und wuchsen spontan weiter. Die Zellen zeigen charakteristische Oberflächenmarker der CLL (hohe Expression von CD19, CD20, CD23, CD40, CD80, CD86) und weisen Merkmale eines aggressiven Phänotyps auf (unmutierte variable Immunglobulin-Schwerketten, CD38 positiv); zudem liegt eine 17-p Deletion vor. Wie in den meisten CLL-Fällen ist Bcl-2 auch in MEC-1 Zellen überexprimiert; im Unterschied zu diesen sind MEC-1 Zellen allerdings CD5-negativ (Stacchini et al. 1999).

Als Stromazelllinie wurden M2-10B4 Zellen verwendet. Dies ist eine adhärente Zelllinie aus murinen Knochenmarksfibroblasten, die eine konfluente Schicht bilden und in der Lage sind, CLL-Zellen einen Teil ihrer natürlichen Mikroumgebung zu ersetzen (Edelmann et al. 2008).

2.1.5 CLL-Zellen

CLL-Zellen wurden nach vorheriger Einverständniserklärung aus dem Blut von Patienten mit B-CLL entnommen, die in der Klinik für Hämatologie am Universitätsklinikum Essen behandelt wurden (positives Votum der Ethikkommission: Referenznummer 04-2459). Tabelle 14 (Kapitel 7.1) zeigt eine Übersicht über die verwendeten Patientenproben. Es wurde keine Korrelationsanalyse von Ergebnissen dieser Arbeit mit Patientencharakteristika (z. B. Binet Stadium, zytogenetische Merkmale) durchgeführt.

2.1.6 NOD/SCID Mäuse

Für die Fremd-Einpflanzungsexperimente (engl.: „*Xenograft*“-Experimente) mit Mäusen wurden der Stamm „*NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J*“ der Firma The Jackson Laboratory, Maine, USA verwendet. Diese sogenannten NOD/SCID („*Non-obese diabetic/Severe combined immune deficiency*“) Mäuse weisen vor dem Hintergrund der NOD-Mutation eine schwere Immunschwäche (SCID) auf, die bedingt ist durch einen Defekt in der Neuordnungsfunktion (engl.: „*Rearrangement*“) der B- und T-Zell-Rezeptoren. Dies führt dazu, dass von den

Tieren keine funktionalen T- und B-Lymphozyten hergestellt werden können und lymphatische Organe wie z. B. Thymus und Lymphknoten sehr klein ausgebildet sind (Custer et al. 1985). Sie besitzen allerdings eine intakte hämatopoetische Mikroumgebung und sind dadurch gut geeignet für das Einpflanzen (engl.: „*Engraftment*“) von CLL-Zellen (Dürig et al. 2007).

Die Tierhaltung und Zucht wurde in den Räumen des Zentralen Tierlabors (ZTL) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt (Genehmigung für den Tierversuch: G 1124/10 – AZ: 87 – 51.04.2010.A133). Im ZTL herrschen standardisierte Versuchsbedingungen durch kontrollierte Umweltbedingungen. Die Tiere wurden unter sterilen und klimatisierten Bedingungen gehalten, die Raumtemperatur betrug 20 - 24° C, die Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 % und die Fütterung erfolgte mit sterilisiertem Wasser und Trockenfutter. Der Lichtwechsel war den endogenen zirkadianen Rhythmen der Tiere angepasst. Für die Versuche wurden Tiere beider Geschlechter im Alter zwischen acht und fünfzehn Wochen verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Isolierung von CLL-Zellen aus Patientenblut

Patientenblut wurde 1:1 mit PBS verdünnt, vorsichtig auf etwa dasselbe Volumen *Ficoll*[®] (*Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer*) pipettiert und mit 1.000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang ohne Bremse abzentrifugiert. Dies führt zu einer Auftrennung der einzelnen Zelltypen und Blutbestandteile anhand der Dichte: *Ficoll*[®] hat eine höhere Dichte als PBS und Plasma und befindet sich unten im Falcon, zusammen mit größeren Zellen und auch den Erythrozyten; über dem *Ficoll*[®] befindet sich die wässrige Phase, die aus PBS, Plasma und kleineren Zellbestandteilen besteht. Zwischen beiden Phasen (Interphase) befinden sich die mononukleären Zellen, zu denen auch die Lymphozyten gehören. Durch vorsichtiges Abpipettieren können diese separiert werden. Durch Waschen mit PBS und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen gereinigt. Anschließend wurde Erythrozyten-Lysepuffer dazugegeben, zwei - fünf Minuten inkubiert, mit PBS verdünnt und zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Erythrozyten zu

entfernen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Medium aufgenommen. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte gezeigt werden, dass die Zellsuspension in der Regel mehr als 90 % CLL-Zellen und weniger als 10 % T-Lymphozyten enthält.

2.2.1.2 Umgang mit den Zelllinien MEC-1 und M2-10B4

Die Zelllinie MEC-1 wurde in IMDM-Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin - Zusatz bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Abstand von 48 Stunden wurden die Zellen aufgeteilt bzw. passagiert.

Die Zelllinie M2-10B4 wurde in demselben Medium unter denselben Bedingungen inkubiert bzw. aufgeteilt oder passagiert. Da diese Zelllinie adhärent ist, mussten die Zellen vor der Aufteilung bzw. dem Passagieren mit Trypsin behandelt werden. Dazu wurde das Medium in der Zellkulturflasche abgenommen und 10 ml Trypsin für 5 Minuten auf die Zellen gegeben, die Flasche dabei leicht geschwenkt. Danach wurden die nun abgelösten Zellen einmal mit PBS gewaschen und wieder in Medium aufgenommen.

2.2.1.3 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mit einer Neubauer Zählkammer

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer kann die Anzahl an Zellen in einer Suspension gezählt werden. Eine Neubauer Zählkammer ist eine 30 x 80 mm große Glasplatte mit einer Mittelfläche, in die definierte, durch Linien getrennte, quadratische Vertiefungen eingätzt sind (Zählfläche); die gesamte Zählfläche besteht aus vier Quadraten mit jeweils 16 Zählfeldern. Legt man ein planes Deckgläschen über die ganze Zählfläche, entsteht ein Raum mit einem bestimmten, definierten Volumen (in der Regel 1 µl). Durch vorsichtiges seitliches Aufpipettieren wird genau dieses Volumen der zu zählenden Suspension durch Kapillarkräfte in diesen Raum gesaugt. Unter dem Lichtmikroskop kann die Anzahl der Zellen pro quadratischer Vertiefung gezählt werden. Anhand der folgenden Formel wird die Anzahl der Zellen pro ml errechnet.

$$X [\text{Zellen/ml}] = A \times \text{Verd.} \times 1000$$

X = Zellen pro ml Suspension

A = Zählergebnis (Mittelwert aus vier Quadraten)

Verd. = Faktor der Verdünnung mit Färbelösung, z. B. 10 bei einer 1:10 Verdünnung

1000 ergibt sich als Faktor aus der Hochrechnung von 1 µl Volumen in der Kammer auf einen ml

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mit Türks-Lösung

Türks-Lösung ist eine Färbelösung, die den Vorteil bietet, dass die darin enthaltene Essigsäure kleinere Mengen an Erythrozyten hämolysieren kann. Die Lymphozyten dagegen werden schwach violett angefärbt und können im Lichtmikroskop gezählt werden.

2.2.1.5 Bestimmung der Viabilität mit Trypan Blau Lösung

Trypan Blau ist ein anionischer blauer Azofarbstoff. Er kann in tote Zellen gelangen und diese dunkelblau anfärben. Er wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, so dass diese hell erscheinen. Aufgrund dessen können mit dieser Färbung lebende und tote Zellen unterschieden werden.

2.2.2 Inkubation der Zellen

CLL-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin-Zusatz aufgenommen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in der Dichte $1,5 \times 10^6/\text{ml}$ in 250 ml (insgesamt 10 ml Suspension) oder 650 ml (insgesamt 50 ml Suspension) Zellkulturflaschen ausgesät.

AODN wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und steril filtriert. Von den sterilen Lösungen wurden die entsprechenden Volumina zu den Zellsuspensionen gegeben, so dass eine Konzentration von 10 µM resultierte. Als Leerkontrolle wurde die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung verwendet. Als Negativkontrolle diente ein AODN (SPC4077), welches zwar die gleichen Nukleotide enthält wie SPC2996, aber in veränderter Reihenfolge (engl.: „*Scrambled control*“). Als Positivkontrolle für Versuche, die eine Toll-like-Rezeptor-9 Stimulierung beinhalten, wurde der Toll-like-Rezeptor-9 Agonist ODN2216

verwendet; dieser allerdings (aufgrund der limitierten Menge) nur in der Konzentration 2 μM . Negativ- und Positivkontrolle sind nicht in allen Versuchen verwendet worden. Das Purinanalogon Fludarabin ist in den entsprechenden Versuchen in den Konzentrationen 10 – 100 μM verwendet worden und der gegen CD20 gerichtete monoklonale Antikörper Rituximab in der Konzentration 10 μM .

Anschließend wurden die Zellen im Inkubator bei 37° C und 5 % CO_2 zwischen 4 Stunden und 5 Tagen inkubiert. Unmittelbar anschließend erfolgte die Ernte. MEC-1 Zellen wurden in IMDM-Medium mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin-Zusatz in einer Dichte von $3 \times 10^5/\text{ml}$ Zellen analog der CLL ausgesät und geerntet.

2.2.3 NOD/SCID Xenograft Mausmodell

Für die Xenograft-Experimente wurden die NOD/SCID Mäuse zunächst sublethal (3,0 – 3,25 Gy) bestrahlt, um die Anzahl an eventuell vorhandenen Immunzellen, die ein effektives Engraftment verhindern könnten, zu minimieren. CLL-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, aus dem Blut des Patienten isoliert; allerdings wurde keine Lyse der Erythrozyten vorgenommen und die Zellen wurden in RPMI-Medium ohne FCS-Zusatz aufgenommen. Unmittelbar im Anschluss daran wurden den Mäusen 5×10^7 CLL-Zellen in ca. 100 μl Medium in die Schwanzvene injiziert. Sofort danach wurden entweder die Oligonukleotide SPC2996, SPC280-7 oder SPC4077 in der Konzentration 50 mg/kg Körpergewicht (ca. 1,375 mg pro Maus bei einem mittleren Körpergewicht einer Maus von 27,5 g; das entspricht ca. 137 μl einer Stammlösung von 10 mg/ml) oder dasselbe Volumen physiologischer Kochsalzlösung intravenös appliziert. Nach 4 Stunden wurden den zuvor mittels Isofluran betäubten Mäusen durch Dekapitation mindestens 300 μl Blut, die Ober- und Unterschenkelknochen sowie die Milz entnommen. Das Blut wurde mit kaltem PBS gewaschen und die Erythrozyten mit Erythrozyten-Lysepuffer entfernt. Die Milz wurde gewogen, zerkleinert und durch einen Filter gedrückt; durch Zusatz von Medium wurde eine Suspension hergestellt und diese mit kaltem PBS gewaschen. Die Oberschenkelknochen wurden gereinigt, anschließend das Knochenmark herausgespült, in Medium suspendiert, durch einen Filter gedrückt und mit kaltem PBS gewaschen. Die

Lymphozyten sowohl aus dem Blut als auch aus dem Knochenmark und der Milz wurden jeweils mit Trypan Blau wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben in einer Neubauerkammer gezählt und durchflusszytometrisch, wie in Kapitel 2.2.6 dargestellt, analysiert.

2.2.4 Real time PCR

Die Expression der Bcl-2 mRNA wurde mittels quantitativer Echtzeit- (engl.: „*Real time*“) RT-PCR analysiert.

2.2.4.1 RNA Isolierung aus Zellen

Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Dazu wurden ca. 1×10^7 Zellen der mit Oligonukleotiden oder Kontrolle vorbehandelten Zellen entnommen, und mit RNA-Lysepuffer versetzt. Dieser Puffer enthält unter anderem Guanidiniumisothiocyanat, welches starke denaturierende Eigenschaften besitzt und dadurch in der Lage ist, RNasen zu inaktivieren. Mercaptoethanol wirkt durch seine Fähigkeit, Disulfidbrücken zu lösen, ebenfalls denaturierend. Nach diesem Schritt wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurde Ethanol 70 % dazugegeben, das Ganze in eine RNeasy® Ionenaustauschersäule überführt und kurz abzentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen. Durch die Ethanolzugabe fällt die RNA aus und bleibt während der Zentrifugation im Gegensatz zu anderen Zellbestandteilen an der Silikatbeschichtung der Säule haften. Anschließend wurde die Säule gewaschen, mit einem DNase-Mix (RNase free DNase Set) versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert; dadurch wurden eventuell noch vorhandene DNA-Verunreinigungen entfernt. Nach mehreren Waschschritten wurde die Säule mit 40 µl RNase-freiem Wasser versetzt und die RNA dadurch eluiert.

Die Konzentration an vorhandener Gesamt-RNA und die Konzentration an eventuell vorhandener, verunreinigender Proteine wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie gemessen. Für die RNA-Isolierung wurden das Protokoll, die Materialien und die Puffer des Qiagen RNeasy® Mini Kits verwendet.

2.2.4.2 cDNA Generierung

Im nächsten Schritt wurde innerhalb der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe von Reversen Transkriptasen (RT) selektiv die „messenger“-RNA (mRNA) in „complementary“-DNA (cDNA) umgeschrieben und vervielfältigt. Die Synthese folgte dabei dem allgemeinen Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: „*Polymerase Chain Reaction*“, PCR). Die PCR ist ein Amplifikationsverfahren, mit der eine beliebige DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt werden kann; das Verfahren kann in drei Schritte unterteilt werden:

Im ersten Schritt erfolgt eine Denaturierung der vorliegenden DNA Doppelhelices bei 95° C. Nach der Trennung der beiden Stränge lagern sich im zweiten Schritt bei einer Temperatur zwischen 50° C und 60° C spezifische Oligonukleotide (engl.: „*Primer*“) an die Einzelstränge an (engl.: „*annealing*“). Durch diese Hybridisierung wird der Startpunkt der Synthese für das DNA-replizierende Enzym und damit für den zu amplifizierenden Bereich festgelegt. Im letzten Schritt erfolgt die sogenannte Elongation (Verlängerung) bei 72° C, die eigentliche Synthese eines neuen Doppelstranges mit Hilfe einer thermostabilen *Taq*-Polymerase (*Thermus aquaticus*-Polymerase); diese katalysiert den Einbau der zugegebenen Nukleotide (dNTPs, Desoxyribonukleosid 5'Triphosphate). Denaturierung, Annealing und Elongation werden zyklisch wiederholt. Das führt jeweils zu einer Verdopplung der vorhanden DNA, bei zyklischer Wiederholung also zu einer exponentiellen Vervielfältigung.

Abweichend von der normalen PCR liegt bei der Generierung von cDNA RNA als Matrize vor, die in DNA umgeschrieben werden muss. Für das selektive Vervielfältigen der mRNA werden zunächst sogenannte Oligo-dT Primer benötigt; durch Erhitzen auf 70° C und anschließendes Abkühlen hybridisieren diese mit dem Poly-A Terminus der mRNA und bilden dabei RNA-DNA Duplexe. Anschließend wird ein Mix aus Reverser Transkriptase, dNTPs und rekombinanten RNase-Inhibitoren hinzugegeben. Die Reverse Transkriptase stammt ursprünglich aus einem Retrovirus und ist eine katalysierende RNA-abhängige Polymerase, die gleichzeitig eine RNase H-Aktivität besitzt und daher DNA-RNA-Duplexe abbauen kann. Der Ansatz wird für eine Stunde in einen Thermozykler (engl.: „*Thermocycler*“) gegeben, in dem die weitere Amplifizierung

wie oben beschrieben stattfindet. Für die Generierung der cDNA wurde das *Advantage[®]RT-for-PCR Kit* der Firma ClonTech nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.4.3 Real time PCR

Der quantitative Nachweis der Bcl-2 mRNA Expression wurde mittels *real time* RT PCR (Applied Biosystems *TaqMan[®] Assay*) im BioChip-Labor des IFZ (Institut für Zellbiologie; Priv.-Doz. Dr. Ludger Klein-Hitpass) am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Methode, bei der cDNA amplifiziert und gleichzeitig quantifiziert werden kann. Für die Quantifizierung setzt man die Expression eines bekannten sogenannten Haushaltsgens (engl.: „*house keeping*“ Gens) in Relation zu der Expression des zu betrachtenden Gens, in diesem Fall das Bcl-2-Gen. House keeping Gene zeichnen sich über alle Zelltypen hinweg durch eine konstante Expression aus; in der Regel sind es Gene, die für das Wachstum und Überleben von Zellen essentiell sind. Hier wurde das Gen für *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) verwendet. Als Leerkontrolle wurde immer ein Ansatz ohne DNA mitgeführt; von jeder Probe wurden Triplets gemessen.

Der *TaqMan[®] Assay* ist eine PCR, bei der zusätzlich zu den oben genannten Bestandteilen eine Sonde hinzugegeben wird. Diese Sonde ist selbst ein Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem Fluorochrom verbunden ist und zusammen mit den Primern an die DNA des jeweiligen Zielgens hybridisiert. Das 3'-Ende der Sonde ist mit einem Rhodamin-Derivat besetzt, das eine Fluoreszenzlöschungsfunktion (engl.: „*quencher*“) besitzt und durch einen Phosphatrest blockiert wird. Wenn das Fluorochrom der intakten Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, unterdrückt der Quencher aufgrund der räumlichen Nähe zum Fluorochrom durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) die Anregung und es kommt zu keiner Emission eines Lichtsignals. Während der Elongation trifft nun die Taq-Polymerase auf die Sonde und verdrängt sie. Da sie eine Exonukleaseaktivität besitzt, ist sie in der Lage, diese dabei zu zerschneiden. Dadurch wird der Quencher von der Sonde getrennt und

der FET unterbrochen. Somit kommt es nun bei einer Anregung zur Fluoreszenz. Freie, nicht hybridisierte Sonden werden von der Taq-Polymerase nicht geschnitten, so dass das emittierte Lichtsignal nur von verdrängten Sonden kommt und daher proportional zum Vorhandensein des Zielgens ist.

Gemessen wird, ab welchem Replikationszyklus das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Man bezeichnet diesen Wert als Ct-Wert (engl.: „*cycle threshold*“). Zur relativen Quantifizierung wird von diesem Ct-Wert derjenige der endogen GAPDH-Kontrolle abgezogen. Der resultierende Wert wird als Delta-Ct Wert bezeichnet. Die Delta-Ct Werte drücken die Ergebnisse der mRNA Expression des zu betrachtenden Zielgens (Bcl-2) aus. Dabei steht der Delta-Ct Wert in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur Expression des Gens: Je kleiner der Delta-Ct Wert ist, desto mehr wurde von diesem Gen exprimiert.

2.2.5 Western Blot

Für die Analyse der Bcl-2 Expression auf Proteinebene wurden die zu erntenden Zellen zunächst lysiert, die Proteine mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend ein Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran vorgenommen (engl: „*Western Blot*“). Zum Schluss wurden die Proteine visualisiert.

2.2.5.1 Proteinlyse

Unmittelbar im Anschluss an die Ernte wurden die Zellen lysiert. Dazu wurde das Medium komplett abgesaugt, die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren (engl.: „*snap freeze*“) und anschließend bei -80° C bis zur eigentlichen Lyse gelagert.

Für diese wurde zunächst der Lysepuffer hergestellt. Dazu wurden 2,5 ml vorher hergestellter RIPA-Puffer (2X) mit 2,5 ml PBS und einer halben Tablette *Roche Protease Inhibitor Complete mini* versetzt. Je nach Menge der Zellen in der Probe wurden zwischen 50 µl und 150 µl Lysepuffer auf die noch gefrorenen Proben gegeben und das Pellet durch häufiges Auf- und Abziehen der Pipette in dem Puffer aufgetaut. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf Eis inkubiert und

danach 7 Minuten bei 4° C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die gelösten Proteine befanden, wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Aus diesem Überstand wurden 20 µl für die Gesamtproteinbestimmung (BCA-Assay, siehe Kapitel 2.2.5.2) entnommen und der Rest (33 % der noch vorhandenen Restmenge an Lysepuffer, also 10 µl – 43,3 µl) mit Rotiload® Ladepuffer versetzt und 5 Minuten auf 95° C erhitzt. Der Ladepuffer enthält β-Mercaptoethanol zum Lösen von Disulfid-Brücken und Glycerol zum Beschweren der Probe sowie einen blauen Farbstoff. Durch das Erhitzen schließlich liegen die Proteine linear vor. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben bei -20° C eingefroren.

2.2.5.2 Proteinbestimmung: BCA Assay

Wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben wurden 2 x 10 µl der lysierten Proteine für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Probe entnommen.

Der BCA-Assay nutzt die Eigenschaft von Proteinen, in alkalischem Milieu Cu^{2+} zu Cu^{1+} zu reduzieren (Biuret-Reaktion). Cu^{1+} wiederum reagiert mit Bicinchoninsäure (engl.: „*Bicinchonic acid*“, BCA) quantitativ zu einem Chelatkomplex, der violett gefärbt ist und mit einem UV-VIS Plattenspektrometer bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann. In dieser Arbeit wurde der *BCA Protein Assay* der Firma Pierce nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.5.3 Western Blot: Gelelektrophorese und Blotting

Im Anschluss wurde das Gesamtprotein elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt.

Proteine unterscheiden sich anhand ihrer Größe und, bei gegebenem pH-Wert, anhand ihrer Nettoladung (Überschuss an positiver oder negativer Ladung an den Aminosäuren). In einem elektrischen Feld wandern die Proteine entsprechend ihrer Ladung zu einer der beiden Elektroden (Elektrophorese), z. B. wandern netto negativ geladene Proteine zur Anode. Dieses Prinzip macht sich die SDS-Gelelektrophorese zu Nutze. Dabei wird ein Polyacrylamid-Gel mit dem stark anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat, engl.: „*Sodiumdodecylsulfate*“)

versetzt. Dies bewirkt, dass die Proteine, die elektrophoretisch getrennt werden sollen, alle netto gleichstark negativ geladen sind und daher nur anhand ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Bei einem gegebenen Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Gels wandern kleine Proteine schneller durch das Gel als große Proteine; mittels eines mitlaufenden Markers mit Proteinen bekannter Größe kann so die Molekülgröße der aufgetrennten Proteine anhand ihrer Wanderungsstrecke abgeschätzt werden. Für die vorliegende Arbeit wurde das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) nach Laemmli angewendet. Hierbei durchläuft das Proteingemisch zunächst ein sogenanntes Sammelgel, wo es zu einer scharfen Bande verdichtet und fokussiert wird. Danach wandert es in das eigentliche Trenngel, wo es zur Auftrennung anhand der Molekülgröße kommt. Für diese Arbeit wurde das *Xcell SureLock™ Mini-Cell System* von Invitrogen mit den *NuPAGE 4 - 12 % Bis-Tris SDS-Page Gelen* (1 mm x 10 well) und dem *NP MES SDS Running Puffer* der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben benutzt.

Anschließend erfolgte der eigentliche Transfer der Proteine auf eine Membran (engl.: „*Blot*“).

Bei dem hier angewendeten Nassblot-Verfahren (engl.: „*Wet Blot*“) werden Proteine innerhalb einer Pufferlösung aus einem Gel auf eine Membran, hier eine PVDF (Polyvinylidendifluorid) -Membran gebracht. Dies geschieht ebenfalls durch das Anlegen einer Spannung, so dass die immer noch negativ geladenen Proteine nun hinaus aus dem Gel in Richtung Anode die Membran passieren und auf ihr haften bleiben. Für die vorliegende Arbeit wurde das *Xcell II™ Blot Module* mit dem *NP®* Transferpuffer und der PVDF-Membran der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.5.4 Proteindetektion

Im letzten Schritt wurden die auf der Membran fixierten Proteine in einer Antigen-Antikörper-Reaktion markiert und detektiert.

Dazu wurden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mit einer Milchlösung geblockt. Danach wurde die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper (Anti-Bcl-2 oder Anti- β -Aktin) inkubiert, anschließend mit einem

Meerrettichperoxidase (engl.: *horseradish peroxidase*, *HRP*) -konjugierten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers (Maus oder Kaninchen) gerichtet war. In einer Schale, in der unmittelbar zuvor ein Wasserstoffperoxid-haltiger Puffer und Luminol (enzymatische Chemolumineszenz-Lösungen, ECL-Reagenzien) zu gleichen Anteilen miteinander vermischt worden waren, wurde die Membran kurz geschwenkt; die Meerrettichperoxidase katalysierte dabei die Oxidation von Luminol zu einem lumineszierenden (Licht-emittierenden) Produkt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie gegeben und in eine Fotokassette eingelegt. In einer Dunkelkammer wurden die Lichtsignale auf Filme überführt und diese entwickelt. Anhand des Größenstandards konnten die nun sichtbaren Banden ausgewertet und zugeordnet werden.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Mit einem Durchflusszytometer können Zellen einer Zellpopulation unbekannter Zusammensetzung nach ihrer Größe und Granularität in verschiedene Subpopulationen unterschieden werden. Des Weiteren können Zellen in diesen Subpopulationen mittels Fluorochrom-gebundener Antikörper markiert und analysiert werden. Für die vorliegende Arbeit wurde das Durchflusszytometer *BDTMLSRII* (BD Biosciences) verwendet, um zum einen Viabilität, Apoptose und Zelltod, zum anderen die Expression verschiedener Moleküle auf den Zelloberflächen zu ermitteln.

Aus einer Zellsuspension heraus werden Zellen einzeln durch eine enge Kapillare gezogen und gelangen als laminarer Strom in die Messküvette. Dort trifft ein Laser auf die Zellen und das zuvor monochromatische, fokussierte Licht des Lasers wird gebeugt und gebrochen. Das gestreute Licht wird mit Hilfe verschiedener Detektoren aufgefangen, gefiltert und analysiert. Das Vorwärtstreulicht (engl.: „*Forward Scatter*“, FSC) ist dabei das Maß für die Beugung des Lichtes, welche vom Volumen der Zelle abhängt; das Seitwärtstreulicht (engl.: *Sideward Scatter*, SSC) ist dagegen ein Maß für die Brechung des Lichtes und ist abhängig von der Oberfläche und Granularität der Zellen.

Trägt man FSC gegen SSC in einem Diagramm auf, erhält man z. B. bei der Analyse von Zellen des Blutes verschiedene Populationen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten), die bereits in einer Punkte-Darstellung (engl.: „Dot Plot“) anhand ihrer Größe und Granularität voneinander unterschieden werden können. Abbildung 6 zeigt eine FSC/SSC Punkte-Darstellung humaner Blutzellen.

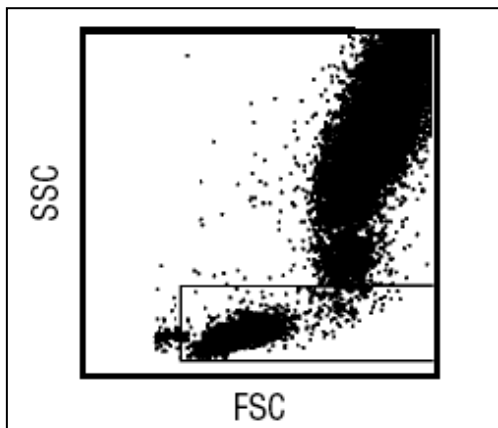


Abbildung 6: FSC/SSC Punkte-Darstellung der Signale von humanen Blutzellen

Die Signale der sehr kleinen Zellen befinden sich näher zum Schnittpunkt der X- mit der Y-Achse. Je stärker das FSC-Signal, desto größer ist die detektierte Zelle; je stärker das SSC Signal, desto granulärer ist die Zelle. Es sind drei verschiedene Populationen zu erkennen: Innerhalb des gezeichneten Kastens die Lymphozyten, etwas darüber die Monozyten, und die größere Population am oberen rechten Rand sind die Granulozyten. Abbildung aus: BD Biosciences 2010.

Zusätzlich kann durch vorherige Inkubation mit Antikörpern, an die verschiedene Fluorochrome konjugiert sind, die ausgewählte Zellpopulation weiter analysiert werden. Die Antikörper binden in einer Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch an die ausgewählte Zielstruktur entweder auf der Oberfläche der Zellen oder, im Falle einer intrazellulären Färbung, innerhalb der Zellen. In der Messküvette treffen insgesamt drei Laser auf die einzelne Zelle: Ein blauer Argonionenlaser (*Coherent SapphireTM*), ein roter Helium-Neon-Laser (*JDS Uniphase 1344P*) und ein violetter Laser (*Coherent RadiusTM405*). Die Laser haben jeweils eine bestimmte Wellenlänge und können damit die Fluorochrome, die an die Antikörper gebunden sind, anregen (engl. „*excitation*“). Die angeregten Fluorochrome emittieren das Licht wiederum in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich. Das Licht wird mittels verschiedener Detektoren aufgefangen, gefiltert und analysiert.

Als Fluorochrome wurden in der vorliegenden Arbeit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Peridin-Chlorophyll-Protein Cyanin-5 (PC-5) und 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in den von den Herstellern empfohlenen Konzentrationen und Färbungsvorschriften verwendet.

Die Analyse und Auswertung der Versuche wurde mit der *BD FACSDiva™* Software durchgeführt.

2.2.6.1 Auswertung der Oberflächenfärbung

Um das Ausmaß der Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf den Zelloberflächen der CLL-Zellen nach der Behandlung mit den Oligonukleotiden zu untersuchen, wurde die Expression von CD20 und CD40 untersucht.

Zunächst wurde im FSC/SSC Dot-Plot die Lymphozytenpopulation eingeschlossen. Von dieser Population wurde ein CD19/CD5 Dot-Plot erstellt und die Population, die CD5- und CD19-positiv war, umschlossen (CLL-Zellen). Innerhalb dieser ausgewählten Population wurden sowohl die Verteilung der CD20- als auch der CD40-Färbung in einem Histogramm-Plot dargestellt und der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (FI) mit Hilfe der BD FACS DIVA™ Software bestimmt.

Um das Vorhandensein von humanen CLL-Zellen im Blut, im Knochenmark und in der Milz der NOD/SCID Mäuse zu untersuchen wurde ebenfalls zunächst ein FSC/SSC Dot-Plot erstellt und der ungefähre Bereich der humanen Lymphozyten eingegrenzt. Innerhalb dieses Bereiches wurde ein Histogramm-Plot mit dem Oberflächenmarker für humane Zellen, CD45 erstellt. Die CD45-positive Kurvenspitze bezeichnet die Population der humanen Zellen. Innerhalb dieser Population wurde ein CD5/CD19-Dot-Plot erstellt und daraus die CD5/CD19-positive Population (CLL-Zellen) ermittelt. Zum einen wurde damit die Anzahl der humanen CLL-Zellen pro 100.000 gemessener Zellen des Blutes bzw. des Knochenmarks gezählt, zum anderen wurde der prozentuale Anteil der humanen CLL-Zellen ins Verhältnis zu der Gesamtzellzahl in der Milz gesetzt und somit die absolute Anzahl CLL-Zellen in der Milz einer Maus ermittelt.

2.2.6.2 Auswertung des Annexin-V Assay zur Bestimmung der Viabilität

Um das Ausmaß der Apoptose und des Zellsterbens zu ermitteln, wurde ein Annexin-V Assay verwendet. Zunächst wurde im FSC/SSC Dot-Plot die Lymphozytenpopulation umschlossen. Von dieser Population wurde ein CD19/CD5 Dot-Plot erstellt und die Population, die CD5- und CD19-positiv war, eingeschlossen (CLL-Zellen). Anschließend wurde von dieser Population ein Dot-Plot erstellt, in dem Annexin-V (X-Achse) gegen DAPI (Y-Achse) aufgetragen wurde. Die Population unten links im Plot ist dabei die Annexin-V- und DAPI-ungefärbte Population; diese Zellen leben. Die Population rechts unten beschreibt die Zellen, die zwar noch am Leben sind, aber schon in Apoptose übergehen. Die Population rechts oben schließlich beschreibt die Zellen, die durch Apoptose gestorben sind und in die DAPI als DNA-interkalierende Substanz aufgrund nicht mehr intakter Zellwände eindringen konnte. Eine sehr kleine, wenn überhaupt vorhandene Population links oben beschreibt die nekrotischen Zellen. Der prozentuale Anteil jeder Population wurde mit Hilfe der *BD FACS DIVATM* Software ermittelt.

2.2.7 ELISA

Die Sekretion der Zytokine CCL3 (MIP-1 α) und TNF- α in den Überstand der Zellen ist mittels „*Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay*“ (ELISA) nachgewiesen worden.

ELISA ist ein Nachweisverfahren für Proteine in Lösungen, das auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht. Die zu untersuchende Lösung wird dazu in Vertiefungen eingefüllt, die mit einem spezifischen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein (hier: CCL3 oder TNF- α) beschichtet sind und inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Vertiefungen geleert, ausgewaschen und ein zweiter spezifischer Antikörper dazugegeben. Dieser ist mit einer Meerrettichperoxidase (engl.: „*horseradish peroxidase*“) konjugiert und bindet an die Proteine, die auf dem Boden der Vertiefungen an den ersten Antikörper gebunden vorliegen (engl.: „*Sandwich*“-Prinzip). Nach erneutem Waschen wird eine Substratlösung hinzugegeben und inkubiert. Die Meerrettichperoxidase reagiert mit dem chromogenen Substrat, Wasserstoffperoxid und

Tetramethylbenzidin, und es bildet sich ein blauer Farbstoff. Die Reaktion wird nach einem bestimmten Zeitpunkt durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und es kommt zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Die Intensität der gelben Farbe ist proportional zur Konzentration des nachzuweisenden Moleküls und die Absorption kann innerhalb von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem UV-VIS Plattenspektrometer gemessen werden. Für diese Arbeit wurden das Protokoll und die Materialien und Puffer der *Kits Quantikine® Human CCL3/MIP-1 α* bzw. *Quantikine® Human TNF- α /TNFSF1A* der Firma R&D Systems nach Herstellerangaben verwendet.

Zur Auswertung wurde anhand der Absorptionen der Standards eine Standardkurve erstellt und über die Absorption der einzelnen Bedingung die jeweilige Konzentration ermittelt.

2.2.8 Assay zur Bestimmung der Adhäsion an Stromazellen

Um die Bindungsfähigkeiten von CLL-Zellen an eine Stroma-Zellschicht zu erfassen, wurde ein Adhäsionsassay durchgeführt. 1×10^5 M2-10B4 Zellen wurden jeweils in eine Vertiefung einer Platte mit sechs Vertiefungen ausgesät und mindestens 12 Stunden inkubiert. In dieser Zeit bildeten die Zellen eine konfluente Monoschicht am Boden der Vertiefungen, was mittels Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Anschließend wurde das Medium abgenommen, die Stromazellen vorsichtig mit CLL-Zellen (5×10^6 in 3 ml) überschichtet und dem Medium entweder SPC2996 10 μ M, SPC280-7 10 μ M oder NaCl als Kontrolle zugesetzt. Nach vier Stunden wurden das Medium sowie die nicht-adhärenenten CLL-Zellen über den Stromazellen in einer definierten Weise abgenommen (vergleiche dazu: (Dürig et al. 1999)): Die Platte wurde für 30 Sekunden auf einen Schüttler gestellt und die nicht-adhärenenten Zellen zusammen mit dem Medium in Bewegung versetzt; unmittelbar im Anschluss wurde das Medium vorsichtig abgenommen. 1 ml PBS wurde in jede Vertiefung gefüllt und der Vorgang wiederholt. Diese erste Fraktion (A) wurde in einer Neubauer Zählkammer quantitativ erfasst. Die CLL-Zellen, die an der Stroma-Zellschicht gehaftet haben, wurden danach mit diesen zusammen vom Boden der Vertiefungen abgelöst und

die Anzahl der CLL-Zellen in dieser zweiten Fraktion (B) ebenfalls in einer Neubauer Zählkammer erfasst.

Der prozentuale Anteil der an der M2-10B4 Schicht haftenden CLL-Zellen wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Adhäsion [\%]} = (A/(A+B)) \times 100$$

A = Erste Fraktion (CLL-Zellen, die nicht adhären an die Stroma-Zellschicht binden)

B= Zweite Fraktion (CLL-Zellen, die adhären an die Stroma-Zellschicht binden)

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde verwendet um zu untersuchen, ob SPC2996 ohne Transfektionshilfsmittel in CLL-Zellen gelangen kann.

Dazu wurde SPC2996FAM benutzt, das mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff, dem 6-Carboxyfluorescein (FAM), konjugiert ist; dessen Emissionswellenlänge liegt bei 517 nm und kann mittels eines grünen Filters detektiert werden. Um die Endolysosomen in den Zellen anzufärben wurde der *Lysotracker*[®] der Firma Invitrogen verwendet. Bei saurem pH-Wert wird dieses Molekül protoniert und bildet ein fluoreszierendes Produkt. Daher kann der Lysotracker benutzt werden, um saure Kompartimente innerhalb einer Zelle zu markieren. Die Lysosomen haben einen pH-Wert von ca. 5, daher kann der Farbstoff diese anfärben. Der Lysotracker wird mit dem roten Filter bei 590 nm detektiert. Bereiche in der Zelle, in denen sich sowohl rote als auch grüne Moleküle befinden, können ermittelt werden, indem man beide Filter übereinanderlegt: sich überlappende Bereiche zeigen sich dann als gelbe Signale.

5×10^5 CLL-Zellen wurden in 1 ml Medium suspendiert, mit SPC2996FAM in einer Konzentration von 10 μ M sowie *Lysotracker*[®] in einer Konzentration von 75 nM versetzt und eine Stunde inkubiert. Danach wurde das Medium abzentrifugiert, die Zellen einmal mit Medium gewaschen und eine Minute ein Zytospin bei 1.250 Umdrehungen durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden mit etwas DAPI-Lösung aufgehellt und unmittelbar im Anschluss unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Von repräsentativen Zellen wurden Aufnahmen angefertigt.

2.2.10 Auswertung der Daten

Die vorliegenden Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms *Excel* (Microsoft Office 2007) oder mit *Graph Pad Prism 4* durchgeführt. Für statistische Auswertungen und grafische Darstellung der Daten wurde *Graph Pad Prism 4* verwendet. In den Abbildungen sind, falls nicht anders angegeben, die Mittelwerte und Standardfehler (engl.: „*standard deviation*“, *SD*) dargestellt. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen behandelten Gruppen und Kontrollen wurden bei Experimenten mit der Zelllinie MEC-1 der Mann-Whitney Test, bei Experimenten mit CLL-Zellen der Wilcoxon Test für Paardifferenzen und bei den Xenograft-Experimenten der ungepaarte t-test verwendet; $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Regulation der Zielstruktur Bcl-2

Für den ersten Teil der Arbeit wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene untersucht, ob SPC2996 und SPC280-7 ihre therapeutische Zielstruktur, die Bcl-2 mRNA, an isolierten CLL-Zellen und in einer lymphatischen Zelllinie in vitro regulieren können. Außerdem wurde ermittelt, inwieweit sich mögliche Effekte auf die Viabilität der Zellen auswirken.

3.1.1 Bcl-2 mRNA-Expression

Die Analyse der Bcl-2 mRNA-Expression in MEC-1 Zellen mittels RT-PCR ergab bereits nach drei Tagen Inkubation eine signifikant niedrigere Expression in den mit SPC2996 vorbehandelten Zellen (Abbildung 7).

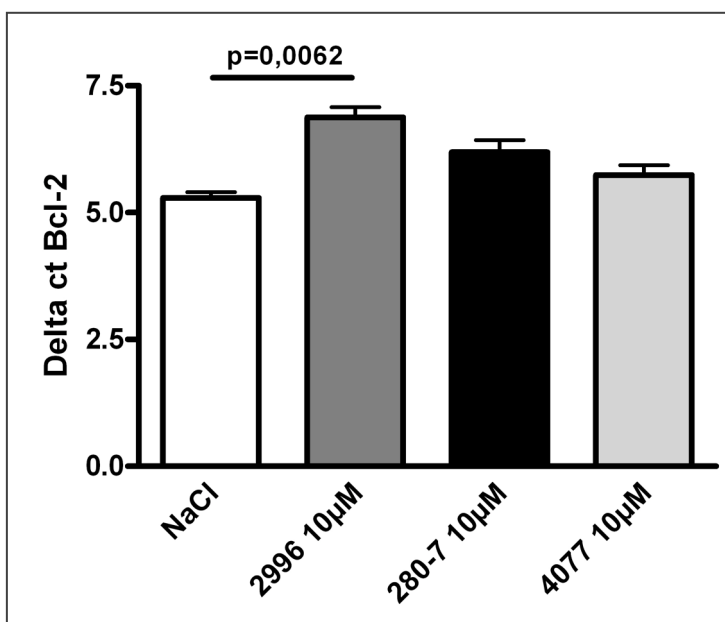


Abbildung 7: Bcl-2 mRNA Expression in der Zelllinie MEC-1

Die Zelllinie wurde drei Tage mit AODN inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD von drei unabhängigen Experimenten.

In primären CLL-Zellen dagegen wurde keine signifikante Änderung der Bcl-2 mRNA-Expression sichtbar (Abbildung 8).

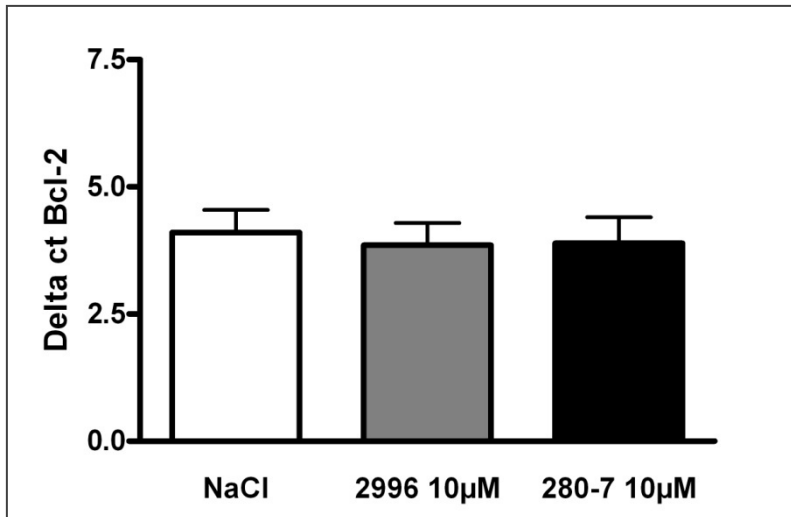


Abbildung 8: Bcl-2 mRNA Expression in CLL-Zellen

Die frisch isolierten CLL-Zellen von sieben unterschiedlichen CLL-Patienten wurden jeweils zwei Tage mit AODN inkubiert. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

3.1.2 Bcl-2 Proteinexpression

Die Proteinexpression von Bcl-2 in MEC-1 Zellen wurde an fünf Zeitpunkten über einen Zeitraum von insgesamt 11 Tagen mittels Western Blot untersucht und war in den behandelten Gruppen über den gesamten Zeitraum deutlich niedriger als in der Kontrolle. Im Vergleich zwischen beiden AODN zeigte sich der Effekt in der mit SPC2996 behandelten Gruppe stärker ausgeprägt (Abbildung 9).

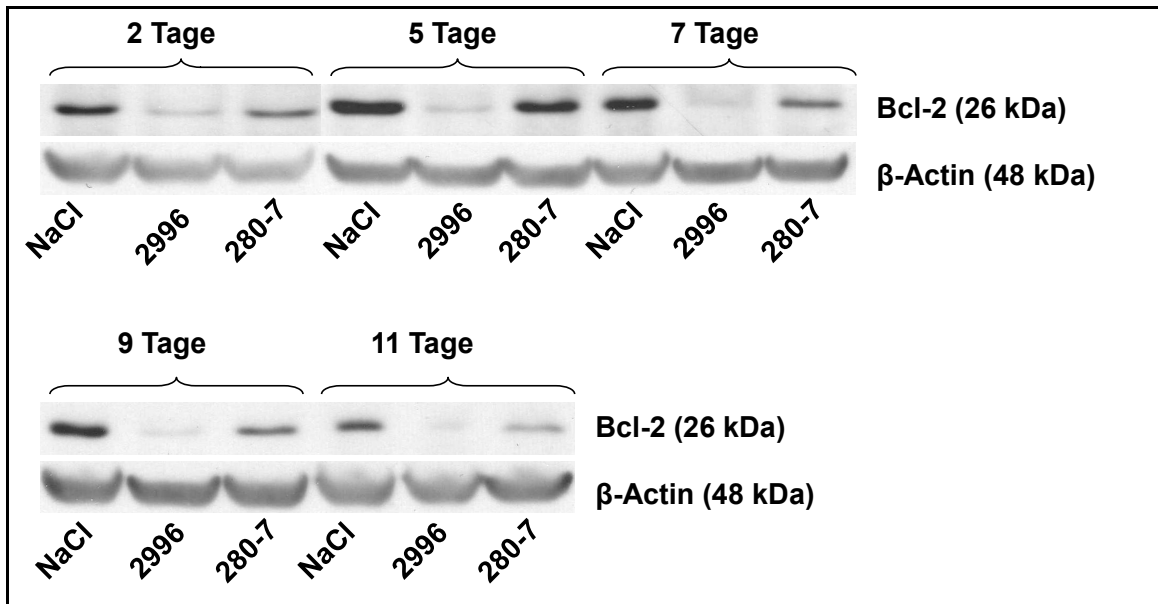


Abbildung 9: Bcl-2 Proteinexpression in der Zelllinie MEC-1

Es wurden zwei Experimente über den gesamten Zeitraum von elf Tagen durchgeführt. Die dargestellte Bcl-2 Proteinexpression ist repräsentativ für die Ergebnisse beider Experimente.

In Übereinstimmung mit den PCR-Ergebnissen zeigte sich in CLL-Zellen, auch nach verschiedenen Inkubationszeiten, keine Verminderung der Proteinexpression in den behandelten Gruppen (Abbildung 10).

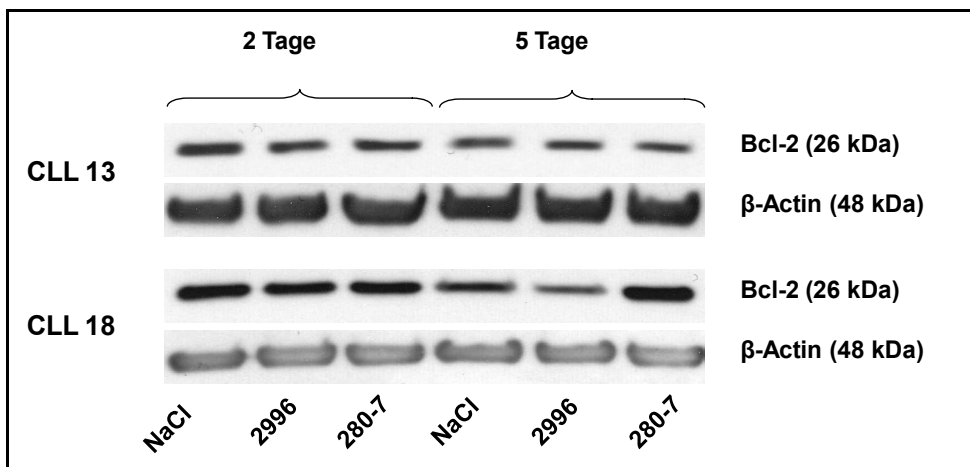


Abbildung 10: Bcl-2 Proteinexpression in CLL-Zellen

Es wurden fünf Experimente über zwei Tage und neun Experimente über fünf Tage mit frisch isolierten CLL-Zellen von jeweils unterschiedlichen CLL Patienten durchgeführt. Die dargestellte Bcl-2 Proteinexpression ist repräsentativ für die Ergebnisse aller Experimente.

3.1.3 Nachweis der Gymnosis in CLL-Zellen

Die unterschiedlichen Effekte der AODN im Hinblick auf die Regulation des Bcl-2 Zielmoleküls zwischen der Zelllinie MEC-1 und primären CLL-Zellen warfen die Frage auf, ob die Oligonukleotide mit der Methode der nackten Transfektion (Gymnosis) überhaupt in die CLL-Zellen gelangen und dort auch ihren Wirkort erreichen können. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde SPC2996 mit einem grünen Farbstoff markiert und seine Anwesenheit in CLL-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 11).

Bekannt ist, dass fremde DNA, RNA und auch AODN von B-Zellen schnell erkannt und in den Endolysosomen abgebaut werden (Shoji et al. 1991). Aufgrund dessen wurden die CLL-Zellen zusätzlich mit einem Lysotracker angefärbt.

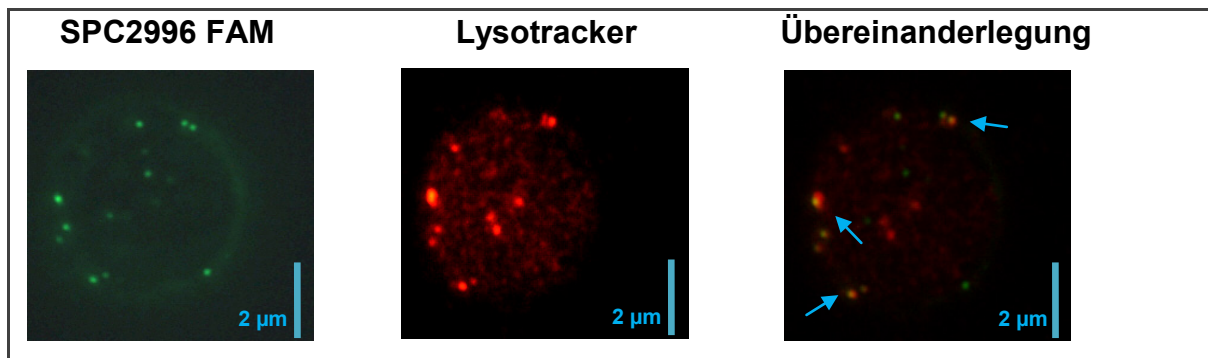


Abbildung 11: Aufnahme von SPC2996FAM in eine CLL-Zelle mittels Gymnosis

Im linken Bild wurde der grüne Filter, im mittleren Bild der rote Filter verwendet. Im rechten Bild wurden der rote und grüne Filter übereinandergelegt. Bereiche, die sowohl ein rotes als auch ein grünes Signal abgeben, erscheinen gelb (mit Pfeil markiert).

Es zeigte sich, dass SPC2996 zwar effektiv in die CLL-Zellen aufgenommen wird, dort aber mindestens zum Teil in die Endolysosomen gelangt.

3.1.4 Einfluss auf Apoptose und Viabilität

Eine weitere wichtige Frage war, ob die hier untersuchten AODN unabhängig von ihrer Fähigkeit, die Bcl-2 Expression zu senken, auch das Überleben von CLL-Zellen bzw. MEC-1-Zellen beeinflussen können. Wie die Abbildungen 12-15 zeigen, konnte weder in der MEC-1-Zelllinie noch in CLL-Zellen eine bedeutsame

und signifikante Beeinflussung der Apoptoserate bzw. Viabilität der Zellen durch die Oligonukleotide alleine erreicht werden.

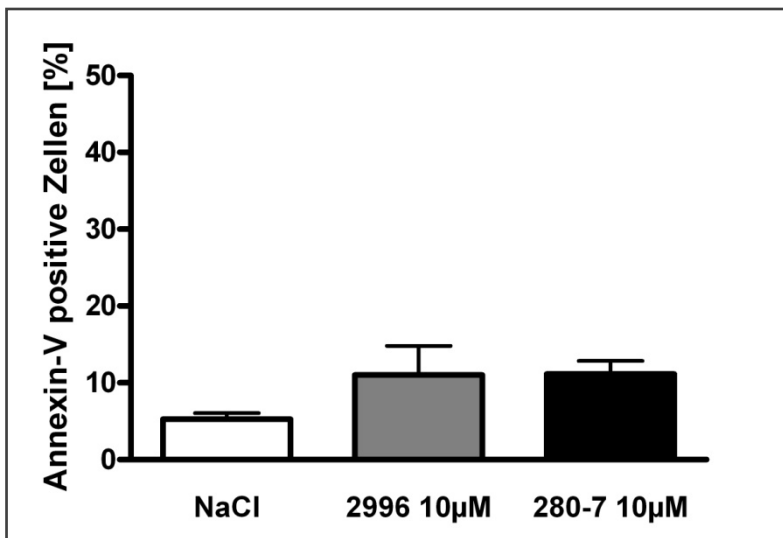


Abbildung 12: Leicht erhöhte Apoptoserate in MEC-1 Zellen

Nach drei Tagen Inkubation mit AODN wurde die Apoptoserate mittels durchflusszytometrischer Annexin-V Messung ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD für drei unabhängige Experimente.

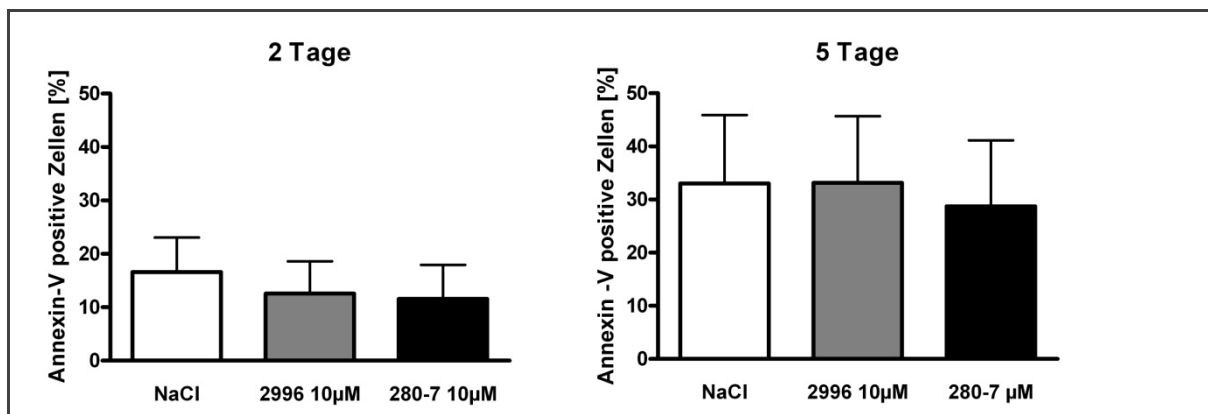


Abbildung 13: Apoptose in CLL-Zellen

Frisch isolierte CLL-Zellen von fünf unterschiedlichen CLL-Patienten wurden zwei bzw. fünf Tage mit AODN inkubiert. Die Apoptoserate wurde mittels durchflusszytometrischer Annexin-V Messung ermittelt, angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

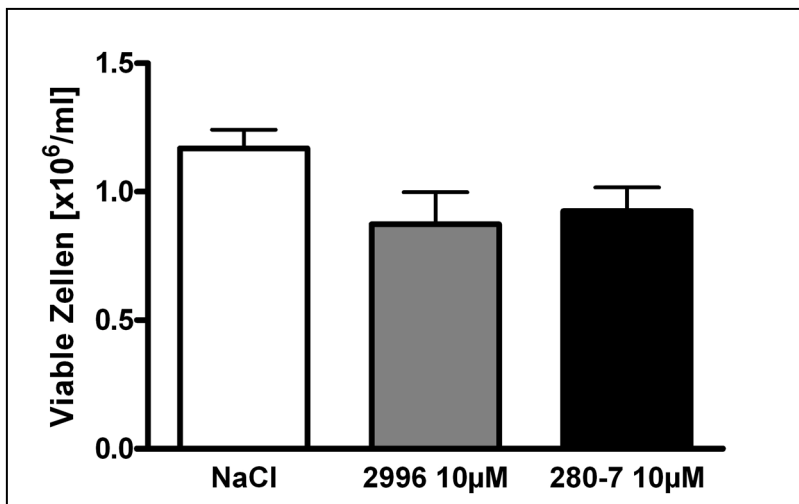


Abbildung 14: Viabilität der MEC-1 Zelllinie

In fünf unabhängigen Experimenten wurden MEC-1 Zellen drei Tage mit AODN inkubiert und die Viabilität mittels Trypan Blau Färbung bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

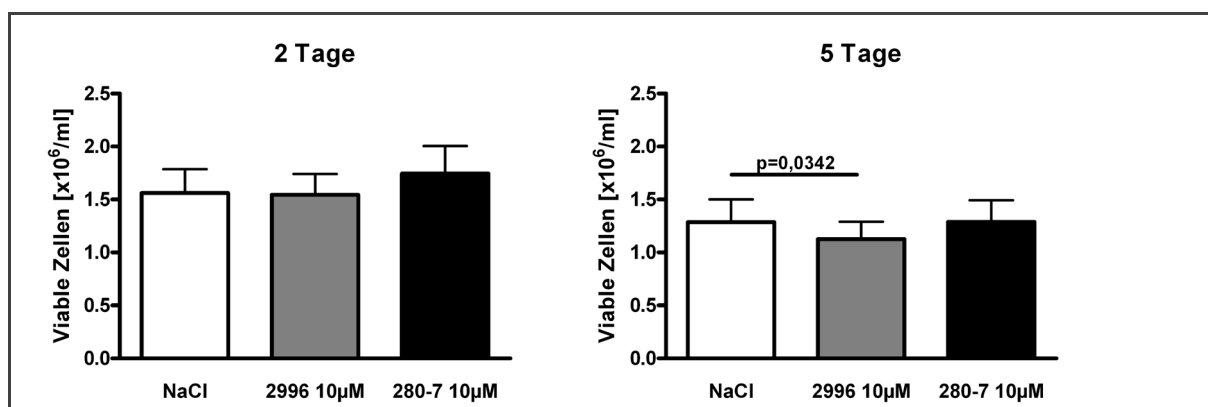


Abbildung 15: Viabilität der CLL-Zellen

Frisch isolierte CLL-Zellen von zehn (2 Tage Inkubation) bzw. dreizehn (5 Tage Inkubation) unterschiedlichen CLL-Patienten wurden mit AODN inkubiert und die Viabilität mittels Trypan Blau Färbung bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

Weiterhin wurde untersucht, ob AODN in der Zelllinie MEC-1, bei der eine Beeinflussung der Bcl-2 Expression in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 gezeigt werden konnte, die Wirkung des routinemäßig für die Behandlung der CLL verwendeten Purinanalogs Fludarabin verstärken können (Abbildung 16).

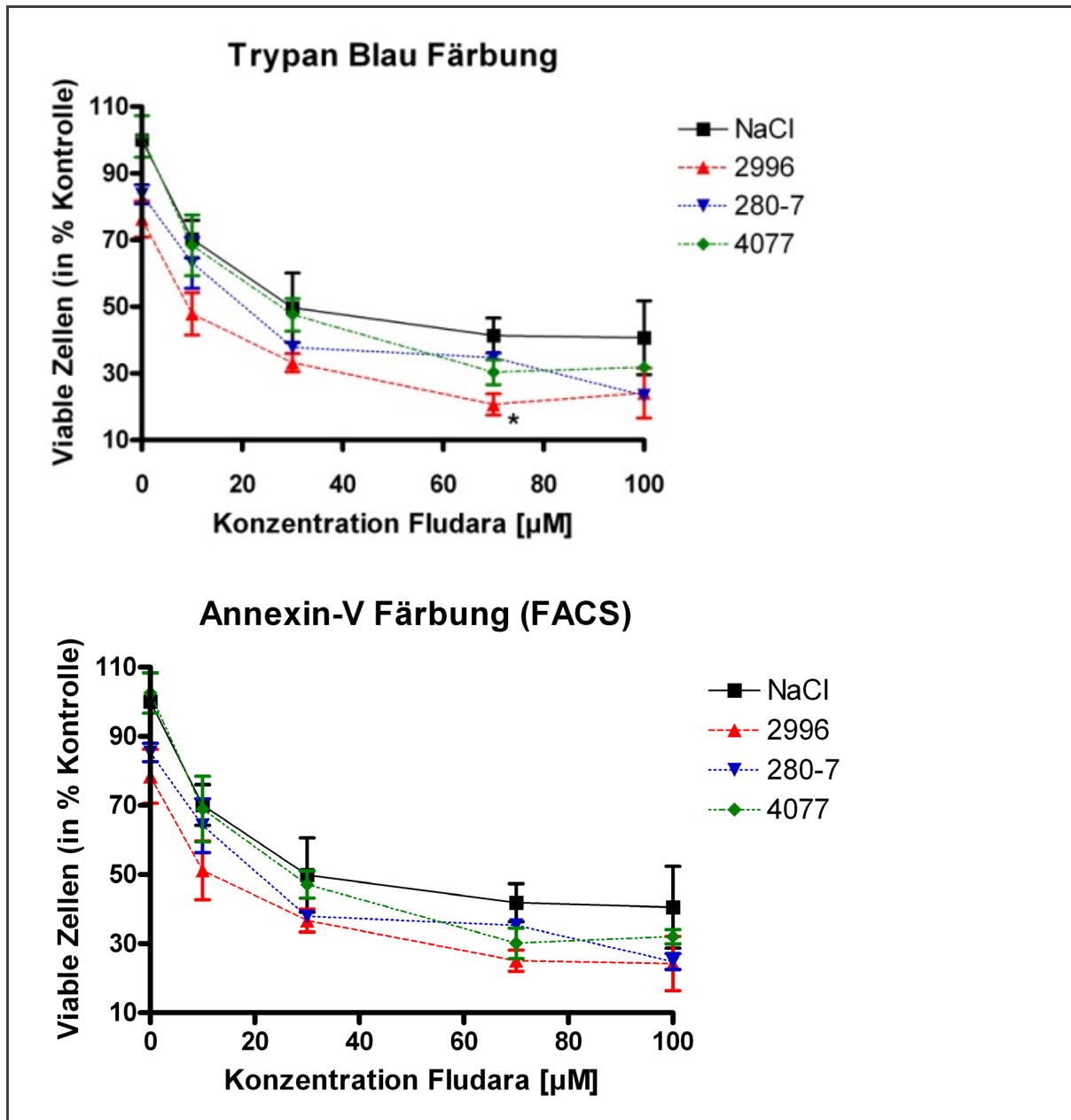


Abbildung 16: Additiver Effekt von Fludarabin mit AODN

Die MEC-1-Zellen wurden zwei Tage mit AODN inkubiert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen Fludarabin versetzt. Nach einem weiteren Tag wurde die Viabilität sowohl mittels Trypan Blau Färbung als auch durchflusszytometrisch mittels Annexin-V Färbung ermittelt. Die LD₅₀ von Fludarabin konnte durch die Vorinkubation mit SPC2996 um ca. 75 % gesenkt werden. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD von drei unabhängigen Experimenten.

Durch die Vorinkubation insbesondere mit SPC2996, in geringerem Ausmaß auch mit SPC280-7, gelang es, die LD₅₀ von Fludarabin von 39,8 µM (Trypan Blau

Färbung) bzw. 40,0 μM (Annexin-V Färbung) auf 8,35 μM bzw. 10,46 μM zu senken. Dabei handelt es sich um einen additiven Effekt.

3.2 Charakterisierung der Nebeneffekte

Von einzelsträngigen Oligonukleotiden mit CpG-Motiven ist bekannt, dass sie in CLL-Zellen eine Aktivierung des Toll-like-Rezeptor-9 bewirken können und damit NF- κB -vermittelt die Synthese proinflammatorischer Moleküle und eine Aktivierung der Zellen (siehe Kapitel 4.2; (Krieg et al. 1995; Hartmann et al. 2000)). Da der Toll-like-Rezeptor-9 in der Endolysosomenwand lokalisiert ist (Hornung et al. 2002), und im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, dass die AODN in CLL-Zellen mittels Lysotracker in den Endolysosomen nachzuweisen sind (siehe Kapitel 3.1.3), wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, welche Nebeneffekte sich in vitro zeigen, ob diese den Charakter einer Toll-like-Rezeptor-9-Aktivierung aufweisen und hierbei Unterschiede zwischen SPC2996 und SPC280-7 zu beobachten sind.

3.2.1 Ausschüttung von Chemokinen

Über eine CpG-induzierte Stimulation des Toll-like-Rezeptor-9 (TLR-9) kommt es in B-Zellen zu einer Aktivierung des NF- κB -Signalweges mit nachfolgender Produktion und Sezernierung proinflammatorischer Chemokine und Zytokine (Vollmer et al. 2004). In Analogie zu dem von Dürig et al. (Dürig et al. 2011) beschriebenen Vorgehen wurde die Konzentration der TLR-9-NF- κB -Aktivierungsmarker MIP1- α (CCL3) und TNF- α unter verschiedenen Versuchsbedingungen im Zellkulturüberstand gemessen (Abbildung 17 und 18).

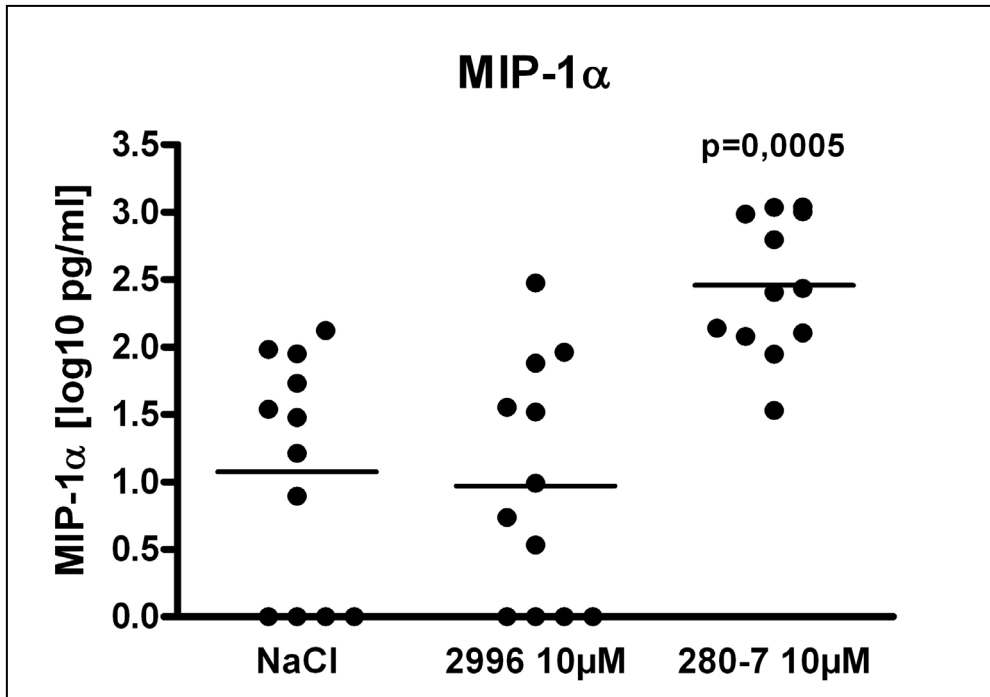


Abbildung 17: MIP-1 α -Ausschüttung von CLL-Zellen nach Inkubation mit AODN

Die Inkubation der CLL-Zellen erfolgte über zwei Tage, die einzelnen Punkte entsprechen jeweils dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Es wurden zehn unabhängige Experimente durchgeführt. Die horizontalen Linien geben die Mittelwerte an.

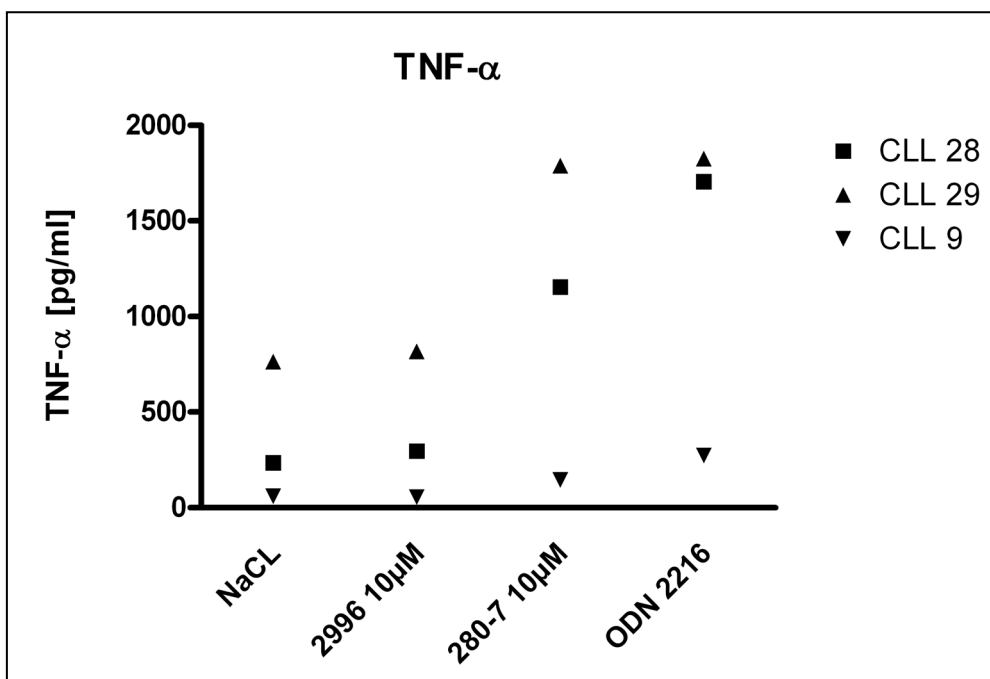


Abbildung 18: TNF- α -Ausschüttung von CLL-Zellen nach Inkubation mit AODN

Die Inkubation der CLL-Zellen erfolgte über zwei Tage, die einzelnen Punkte entsprechen jeweils dem Mittelwert einer Doppelbestimmung. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich die Positivkontrolle ODN2216 verwendet.

Die Versuche haben ergeben, dass mit AODN behandelte CLL-Zellen deutlich mehr Chemokine ausgeschüttet haben. Die Wirkung von SPC280-7 war dabei stärker als die von SPC2996.

3.2.2 Expression von Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche

Auch Oberflächen- und Aktivierungsmarker wie CD20 und CD40 werden nach einer Toll-like-Rezeptor-9 Stimulierung verstärkt exprimiert (Jahrsdörfer et al. 2001). Als weiterer Hinweis auf eine Toll-like-Rezeptor-9 Beteiligung an den Nebeneffekten von SPC2996 und SPC280-7 wurde mittels durchflusszytometrischer Messung untersucht, ob nach zwei bzw. fünf Tagen Inkubation mehr Aktivierungsmarker auf den CLL-Zellen nachzuweisen waren (Abbildung 19 und 20).

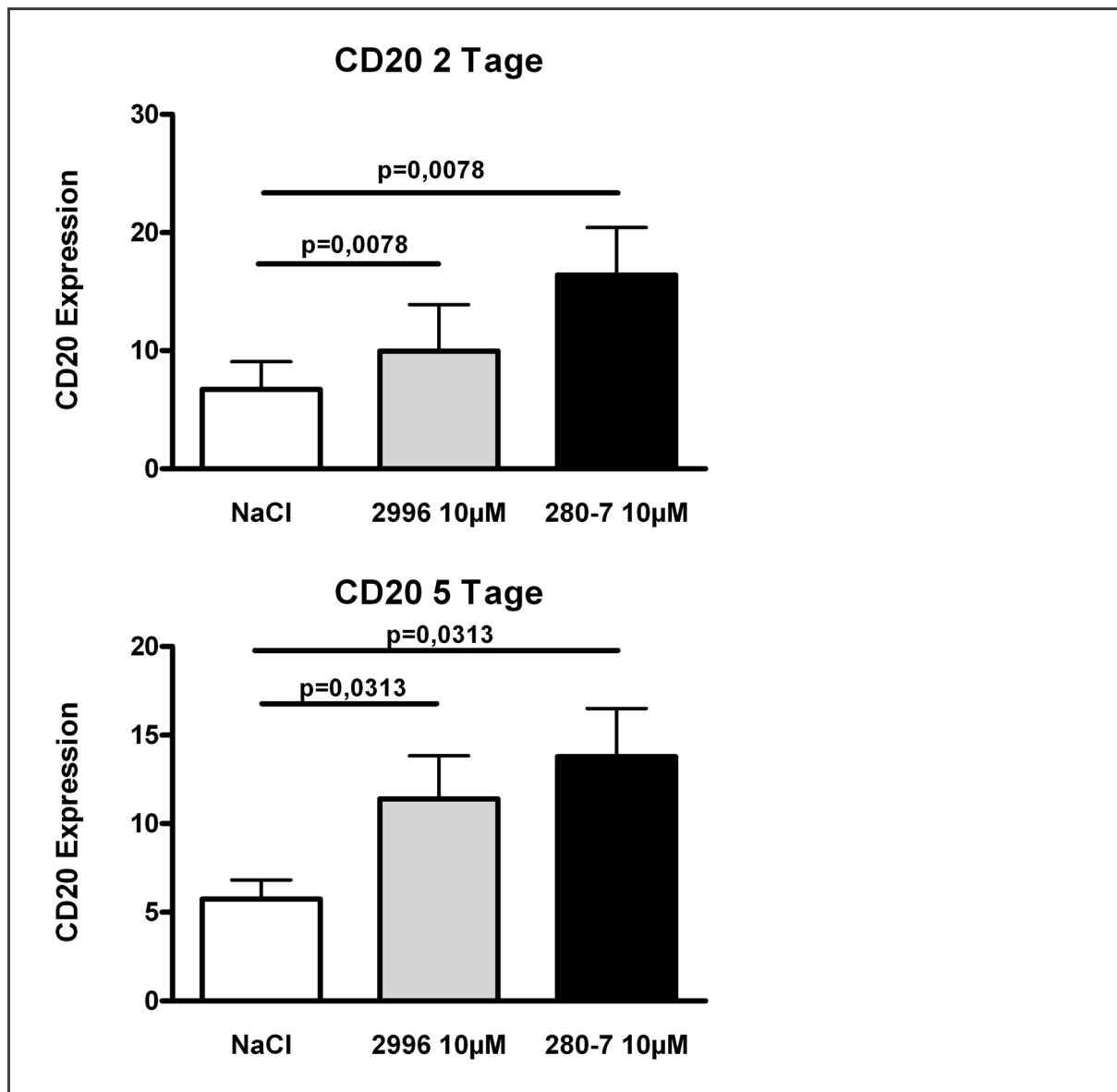


Abbildung 19: CD20 Expression auf CLL-Zellen

Frisch isolierte CLL-Zellen von acht (zwei Tage Inkubation) bzw. sechs (fünf Tage Inkubation) unterschiedlichen CLL-Patienten wurden mit AODN inkubiert und die CD20 Expression auf den Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

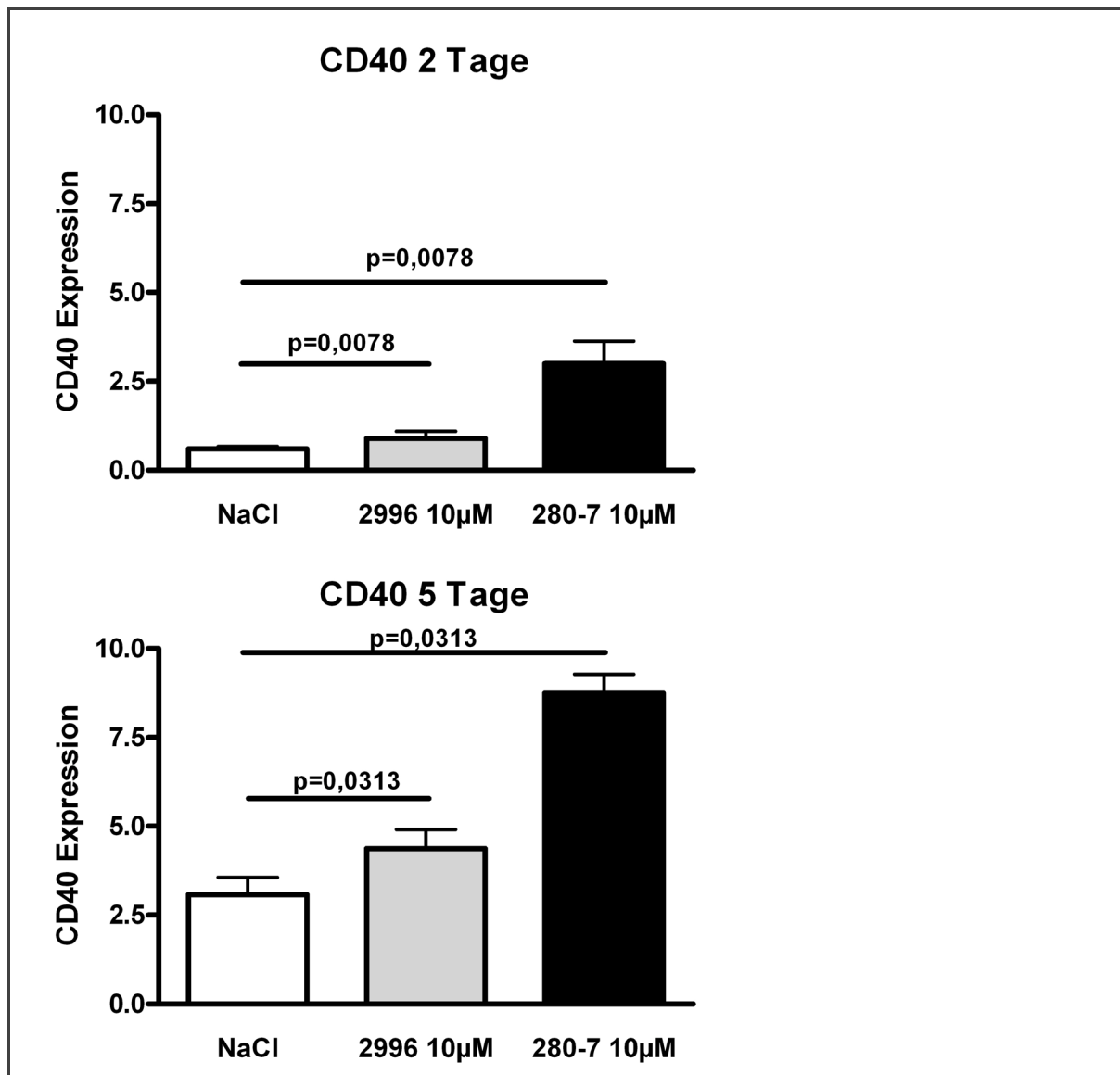


Abbildung 20: CD40 Expression auf CLL-Zellen

Frisch isolierte CLL-Zellen von acht (zwei Tage Inkubation) bzw. sechs (fünf Tage Inkubation) unterschiedlichen CLL-Patienten wurden mit AODN inkubiert und die CD40 Expression auf den Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

Beide Aktivierungsmarker wurden nach AODN-Stimulation der CLL-Zellen deutlich stärker auf den Zelloberflächen exprimiert.

Zusätzlich wurde untersucht, ob CLL-Zellen durch die Aktivierung stärker gegenüber therapeutischen Antikörpern sensibilisiert werden können. Besonders die CD20-Moleküle auf den Oberflächen der CLL-Zellen boten sich als Zielstruktur an, da ein gegen CD20 gerichteter, monoklonaler Antikörper (Rituximab) zur

Verfügung stand, um einen additiven oder synergistischen Effekt auf das Zellsterben zu erreichen (Abbildung 21).

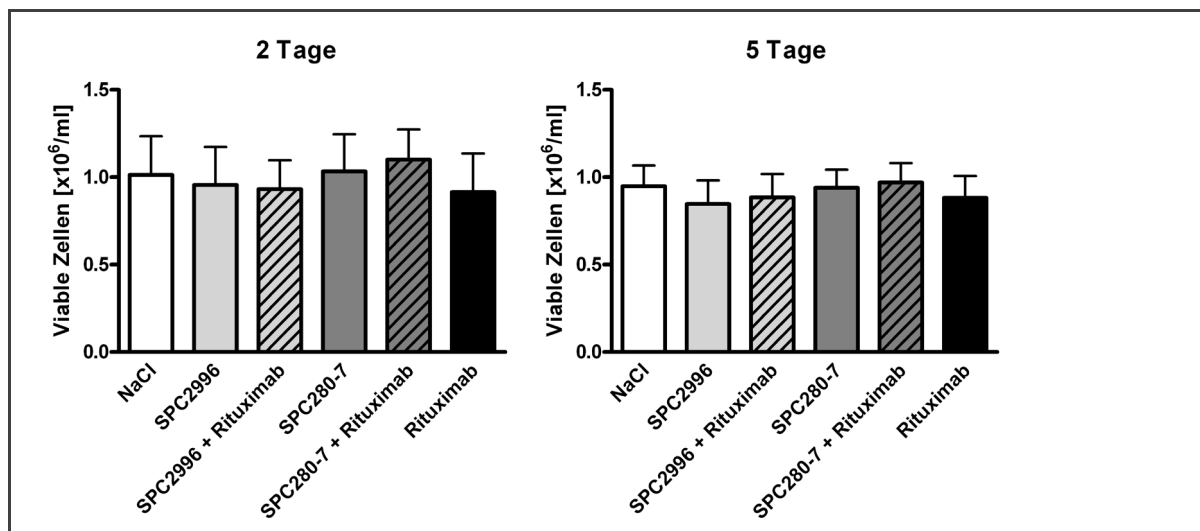


Abbildung 21: Kombination von Oligonukleotiden mit Rituximab

Frisch isolierte CLL-Zellen von vier (zwei Tage Inkubation) bzw. zehn (fünf Tage Inkubation) unterschiedlichen CLL-Patienten wurden mit AODN und Rituximab inkubiert und die Viabilität mittels durchflusszytometrischer Annexin-V Messung ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

Allerdings konnte kein eindeutiger, statistisch signifikanter Effekt auf die Viabilität der CLL-Zellen beobachtet werden.

3.2.3 Effekte von AODN auf die CLL-Stroma-Zell-Adhäsion

In der Arbeit von Dürig et al. wurden auch Gene verstärkt abgelesen, die für Proteine kodieren, welche die Bindung von Lymphozyten an andere Zellen und Gewebe verstärken können (Dürig et al. 2011). Mittels eines Adhäsionsexperimentes konnte nachgewiesen werden, dass sich die Bindungsfähigkeiten von CLL-Zellen an Stromazellen nach Zugabe der AODN in vitro deutlich erhöhen (Abbildung 22).

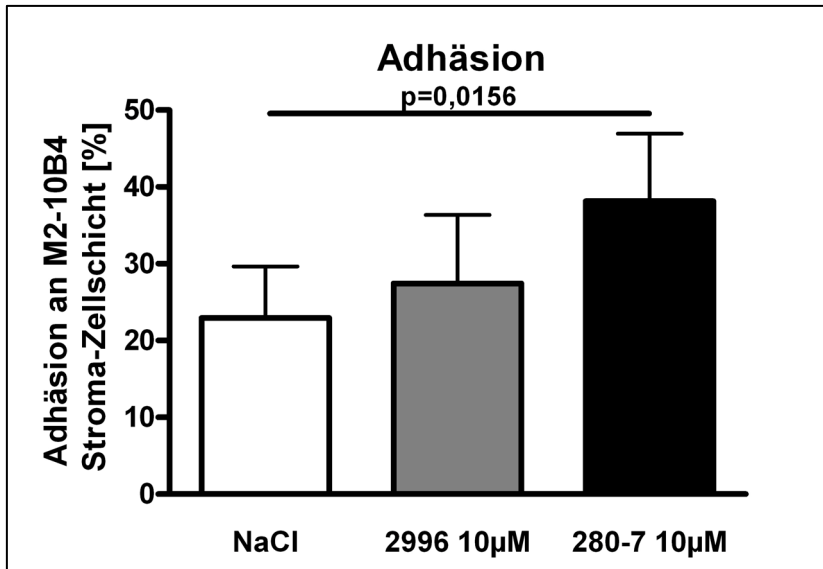


Abbildung 22: Adhäsion von CLL-Zellen an einer M2-10B4 Stroma-Zellschicht

Frisch isolierte CLL-Zellen von sieben unterschiedlichen CLL-Patienten wurden 4 Stunden mit AODN inkubiert und die Adhäsion an eine M2-10B4 Stroma-Zellschicht ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD.

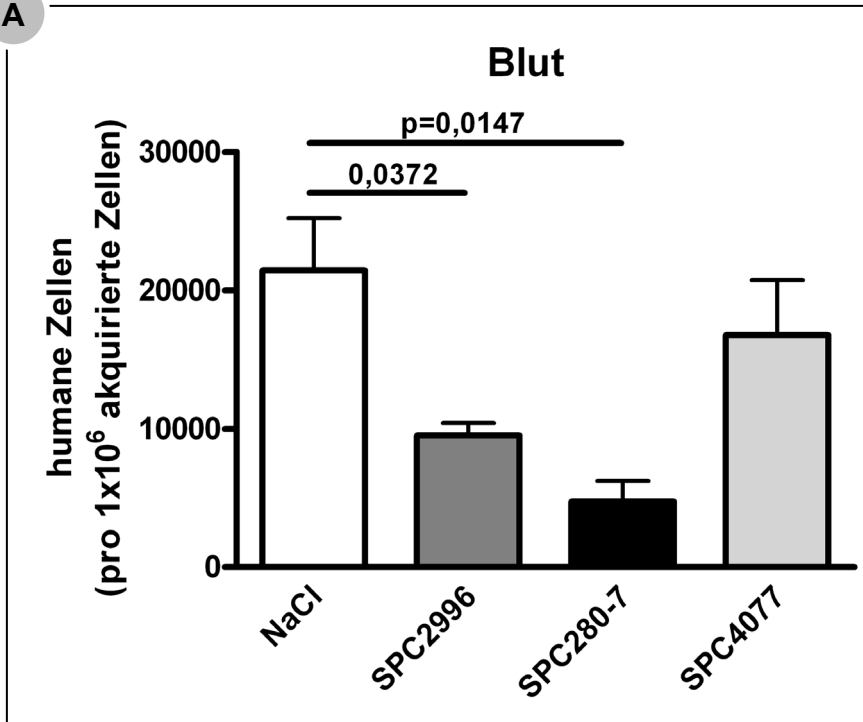
Bereits nach 4 Stunden Inkubation haben signifikant mehr CLL-Zellen, die mit SPC280-7 behandelt worden waren, an der Stroma-Zellschicht gehaftet.

3.3 NOD/SCID Xenograft Mausmodell

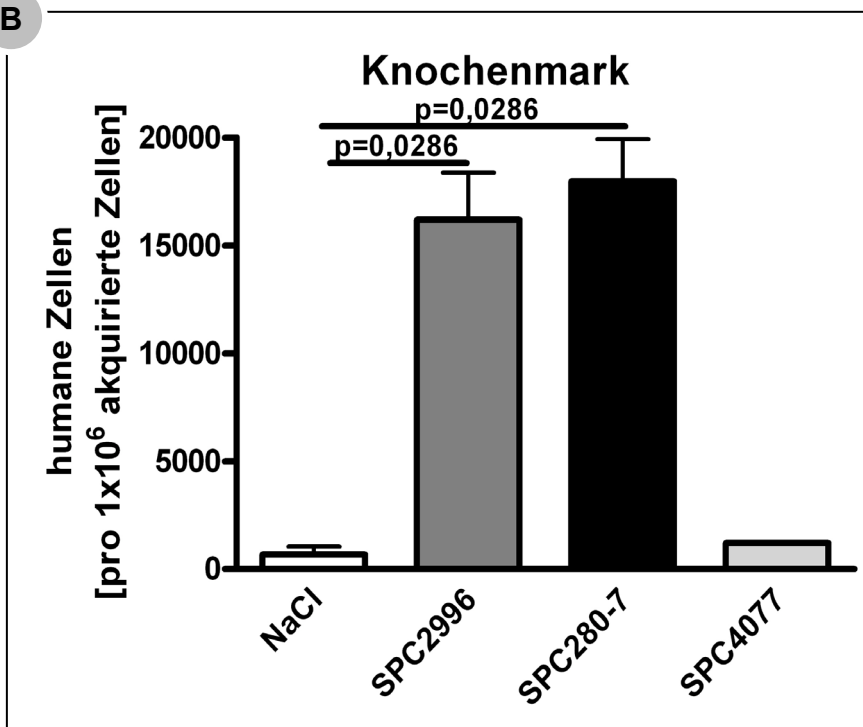
Im letzten Teil der Arbeit wurde die Wirkung der AODN auf CLL-Zellen und ihre Verteilung in einem in vivo Mausmodell untersucht. Die Versuche dienten vor allem der Erklärung der in den Phase-1 Studien beobachteten Verringerung der im Blut zirkulierenden CLL-Zellen (O'Brien et al. 2005; Dürig et al. 2011).

Nach der Vorinkubation der CLL-Zellen mit AODN bzw. Kontrollen und der Injektion in die Mäuse wurde untersucht, in welchen Kompartimenten der Maus sich wie viele humane CLL-Zellen wiederfanden. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 23 A - C dargestellt, in den verschiedenen Kompartimenten Blut, Knochenmark und Milz eine deutlich unterschiedliche Verteilung von CLL-Zellen.

A



B



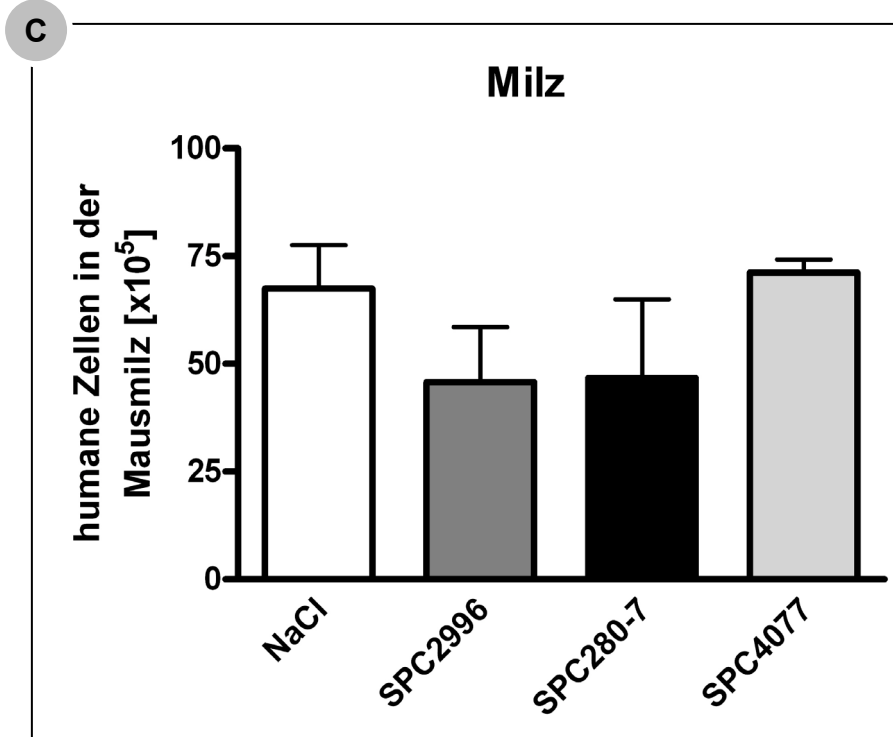


Abbildung 23 A - C: Verteilung humaner Zellen in verschiedenen Kompartimenten der Maus

Durchflusszytometrische Messung von CD45/CD19/CD5-positiven Zellen aus den verschiedenen Kompartimenten der Maus: A, Blut; B, Knochenmark und C, Milz. Angegeben sind die Mittelwerte mit SD aus drei Experimenten.

Im Blut der Mäuse (dargestellt in Abbildung 23 A) fanden sich in den mit SPC2996 oder SPC280-7 vorbehandelten Gruppen signifikant weniger humane Zellen als in den beiden Kontrollgruppen. Im Knochenmark der Mäuse (Abbildung 23 B) hingegen war eine im Vergleich zu den Kontrollen deutlich höhere Anzahl humaner Zellen in den mit SPC2996 und SPC280-7 behandelten Gruppen vorhanden. Die Zahl der Leukämiezellen in den Milzen der Empfängertiere zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23 C). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für eine Umverteilung der mit AODN vorbehandelten CLL-Zellen aus dem Blut und der Milz in das Knochenmark der transplantierten Tiere.

4 Diskussion

4.1 Regulation der therapeutischen Zielstruktur Bcl-2

Innerhalb der letzten zehn Jahre hat es mehrere Veröffentlichungen gegeben, die sich mit den klinischen Eigenschaften von Oblimersen als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika beschäftigen (O'Brien et al. 2005; O'Brien et al. 2007; O'Brien et al. 2009). Bisher konnte in in vitro-Studien nicht bestätigt werden, dass die im Rahmen klinischer Studien beobachteten Effekte durch eine Beeinflussung von Bcl-2 hervorgerufen werden.

Auch das neuartige LNA-Oligonukleotid SPC2996 ist zwar bereits in einer Phase-1 Studie angewendet worden, aber auch hier konnte bisher nicht belegt werden, dass die beobachteten klinischen Effekte auf einer in CLL-Zellen in vitro reproduzierbaren Beeinflussung der Bcl-2 mRNA beruhen (Dürig et al. 2011).

Wie in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 dargestellt, wurde in dieser Arbeit Bcl-2 in der lymphatischen Zelllinie MEC-1 erfolgreich herabreguliert. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit mehreren Veröffentlichungen, in denen gezeigt werden konnte, dass sowohl Oblimersen als auch SPC2996 in vitro in verschiedenen Zelllinien wirksam sind und Bcl-2 sowohl auf Transkriptions- wie auch auf der Proteinexpressions-ebene reduzieren können (Guinness et al. 2000; Stein et al. 2009).

Im Gegensatz dazu war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, eine Beeinflussung der therapeutischen Zielstruktur Bcl-2 in primären CLL-Zellen zu erzielen. Eine mögliche Erklärung für die divergenten Effekte in verschiedenen Zelltypen könnte im unterschiedlichen zytoplasmatischen Transport der AODN nach Aufnahme in die Zielzelle liegen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CLL-Zellen Fluoreszenzfarbstoff-markiertes SPC2996 (SPC2996FAM) in Abwesenheit von Transfektionshilfsmitteln effizient aufnehmen und in Endolysosomen speichern. Eine Färbung des Nukleus mit SPC2996FAM war hingegen nicht nachzuweisen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass SPC2996 den Nukleus als seinen wichtigsten Wirkort in der CLL-Zelle gar nicht, oder nur zum Teil erreicht. Dieses in der neueren Literatur als endosomale Falle (engl.: „*endosomal entrapment*“) bezeichnete Phänomen stellt ein wichtiges Problem in der Entwicklung von AODN dar und wurde in einer von Zhang et al. kürzlich publizierten Arbeit als Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit eines

gegen das HER3 („*human epidermal growth factor 3*“) gerichteten AODN bei verschiedenen Zelllinien diskutiert (Zhang et al. 2010). In dieser Studie beobachteten die Autoren eine effektive Herunterregulation des HER3-Zielmoleküls in 15PC3 Prostatakarzinomzellen, die mit einer nukleären Akkumulation des AODN einherging. In einem Kontrollexperiment unter Verwendung der A549 Lungenkarzinomzelllinie war hingegen eine vornehmlich perinukleäre endolysosomale Anreicherung des AODN, die mit einer fehlenden Regulation der HER3-mRNA korrelierte, festzustellen.

Weiterhin wurde der Effekt der AODN auf die Apoptose und Überlebensfähigkeit der Zellen in Suspensionskultur untersucht. Dabei war eine ausgeprägte Streuung der Versuchsergebnisse zwischen individuellen Leukämieproben und insgesamt keine statistisch signifikante Beeinflussung der genannten Parameter festzustellen. Die Zahl der hier untersuchten Patientenproben war zu niedrig, um eine aussagekräftige Analyse einzelner, durch molekulare Risikofaktoren definierter, Subgruppen durchführen zu können. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wird in der aktuellen Literatur ebenfalls über heterogene sowohl die Proliferation (Decker et al., Blood 2000) als auch die Apoptose der Leukämiezellen stimulierende Effekte (Liang et al, Blood 2010, 115: 5041-52) TLR-9-agonistischer ODN berichtet.

4.2 Charakterisierung der Nebeneffekte

Eine zentrale Rolle in der Betrachtung der Nebeneffekte spielt der TLR-9 (Toll-like-Rezeptor-9). Er gehört zur Familie der Toll-like-Rezeptoren, einem hochkonservierten System der angeborenen Immunabwehr (Medzhitov et al. 1997). Die Familie besteht im humanen System aus den Mitgliedern TLR 1 - 10, wobei die Rezeptoren unterschiedliche Arten von Pathogen erkennen können (Takeda et al. 2005). Der Toll-like-Rezeptor-9 befindet sich in der Endolysosomenwand von B-Zellen und Typ-1 Interferon produzierenden dendritischen Zellen (Hornung et al. 2002) und erkennt bakterielle und virale einzelsträngige DNA-Moleküle mit CpG-Motiv (Hemmi et al. 2000). Er ist dabei in der Lage, DNA von RNA anhand der Raumstruktur des Grundgerüsts (Haas et al. 2008) sowie eigene DNA von bakterieller oder viraler DNA anhand der CpG Motive zu unterscheiden. CpG

Motive sind sich wiederholende Abfolgen der unmethylierten Basen Cytosin und Guanin hintereinander (die Bezeichnung CpG steht für *Cytosin-phosphat-Guanin* und soll anzeigen, dass es sich hierbei um eine Sequenzabfolge und nicht um eine Basenpaarung handelt). Dieses Motiv findet sich gehäuft in bakterieller und viraler, nicht aber in humaner DNA (Bird 1986).

Wenn einzelsträngige DNA-Moleküle mit CpG Motiv in die Endolysosomen gelangen, können sie dort den Toll-like-Rezeptor-9 aktivieren. In einem ersten Schritt wird „*Myeloid Differentiation primary response protein 88*“ (MyD88) mobilisiert, in der Folge wird eine Aktivierungskaskade verschiedener Kinasen bewirkt, an deren Ende die Transkriptionsfaktoren „*Nuclear factor- κ B*“ (NF- κ B) und „*Activating protein-1*“ (AP-1) freigesetzt werden, in den Zellkern gelangen und dort die Synthese einer Vielzahl von proinflammatorischen Chemokinen und Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Aktivierungsmarkern bewirken (Kawai et al. 2006). Abbildung 24 zeigt eine schematische Zusammenfassung des Toll-like-Rezeptor-9 Signalweges.

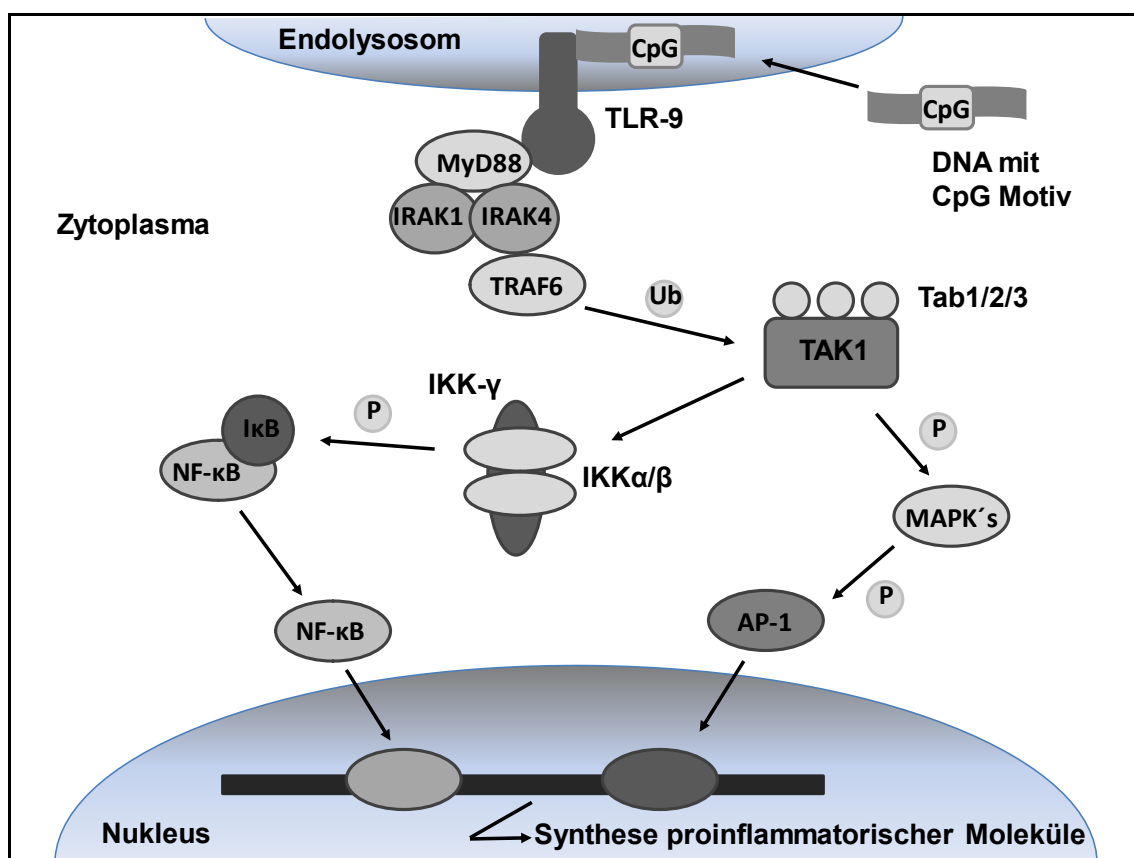


Abbildung 24: Der Toll-like-Rezeptor-9-Signalweg
nach (Kawai et al. 2006)

AODN gelangen nach der Aufnahme in eine Zelle zumindest zum Teil in die Endolysosomen, in denen der Toll-like-Rezeptor-9 lokalisiert ist (Ahmad-Nejad et al. 2002). Wenn sie CpG-Motive tragen, sind sie ebenso wie pathogene DNA in der Lage, den Toll-like-Rezeptor-9 zu aktivieren (Hartmann et al. 2000) und damit die Synthese einer Vielzahl von proinflammatorischen Molekülen und die Aktivierung der Zellen (Jahrsdörfer et al. 2001) zu bewirken. Oligonukleotide, die CpG-Motive enthalten, können als Toll-like-Rezeptor-9 Agonisten verwendet werden. Ein Beispiel für einen Toll-like-Rezeptor-9 Agonisten ist ODN2216 (Krug et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit ist ODN2216 als Positivkontrolle für Toll-like-Rezeptor-9-vermittelte Nebeneffekte verwendet worden.

Da beide in dieser Arbeit verwendeten AODN CpG in ihrer Sequenz tragen, war zu vermuten, dass die im Rahmen klinischer Studien beobachteten proinflammatorischen Nebeneffekte zumindest teilweise auf Toll-like-Rezeptor-9 vermittelte Reaktionen zurückgeführt werden können. Diese Hypothese wird zudem durch Microarrayanalysen bei mit SPC2996 behandelten CLL-Patienten gestützt (Dürig et al. 2011). Dabei konnte eine dosis- und zeitabhängige Heraufregulation sogenannter TLR-Antwortgene (wie z.B. TNF- α und MIP-1 α) in den CLL-Zellen SPC2996 exponierter Patienten nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in der vorliegenden Arbeit in einem in vitro Zellkultursystem auf Proteinebene gezeigt werden, dass SPC2996 tatsächlich die Produktion und Sekretion von TNF- α und MIP-1 α in den Kulturüberstand induziert. Des Weiteren konnte eine Heraufregulation der durch TLR-Agonisten stimulierbaren Aktivierungsmarker CD20 und CD40 auf der Oberflächenmembran der CLL-Zellen (Decker et al. 2000) beobachtet werden. Die weitere Analyse der Genexpressionsstudie von Dürig et al. verwies auf eine Gruppe an hochregulierten Genen, die dem Bereich Chemotaxis und Zellmigration zugeordnet werden konnten (Dürig et al. 2011). Aufgrund dessen wurde in einem Adhäsionsassay an M2-10B4 Stromazellen getestet, wie stark die Adhäsionseigenschaften von CLL-Zellen nach der Exposition mit AODN sind. Die Ergebnisse im Kapitel 3.2.3 zeigen, dass sich die Adhäsion an eine Stromazellschicht nach der Inkubation mit AODN zum Teil signifikant verstärkte.

Im direkten Vergleich der beiden AODN wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten deutlich, dass Oblimersen zum Teil erheblich stärkere Nebeneffekte in CLL-Zellen produzierte als SPC2996.

Jahrsdörfer et al. haben für Oblimersen den Effekt der Toll-like-Rezeptor-9-Stimulation und nachfolgender Aktivierung der CLL-Zellen bereits beschrieben (Jahrsdörfer et al. 2002). In einer Arbeit von Vollmer et al. wurde gezeigt, dass die LNA-Modifikation in Oligonukleotiden zu einer deutlich verminderten Aktivierung des Toll-like-Rezeptor-9 führt und auch eine geringere Synthese proinflammatorischer Moleküle bewirkt (Vollmer et al. 2004). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich mit den Erkenntnissen der erwähnten Veröffentlichungen.

Eine mögliche Erklärung für die geringere Aktivierung des Toll-like-Rezeptor-9 Signalweges durch das LNA-modifizierte AODN SPC2996 im Vergleich zu Oblimersen ist, dass diese sterisch wie eine RNA aussehen und daher weniger der Zielstruktur des Toll-like-Rezeptor-9 ähneln (Obika et al. 1998; Petersen et al. 2000).

4.3 Korrelation der präklinischen Daten mit den Phase-1 Studien (O'Brien et al. 2005; Dürig et al. 2011)

Sowohl in den klinischen Veröffentlichungen zu Oblimersen als auch in der Phase-1 Studie zu SPC2996 ist eine zum Teil starke Reduktion der im Blut zirkulierenden CLL-Zellen innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen nach Applikation der AODN beschrieben worden (O'Brien et al. 2005; Dürig et al. 2011). Da weder im Rahmen der klinischen Studien noch durch die hier dargestellten in vitro Experimente eine überzeugende AODN-vermittelte Herunterregulation des Bcl-2-Zielmoleküls in primären CLL-Zellen nachgewiesen werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei in erster Linie um eine Umverteilung der Leukämiezellen aus dem Blut in das Gewebe und nicht um einen zytotoxischen Effekt handelt. Für diese Erklärung spricht auch, dass die Zahl der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut einige Wochen nach Abschluss der Therapie wieder anstieg (Dürig et al. 2011).

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, wurde ein 2007 erstmals beschriebenes CLL NOD/SCID Xenograft-Modell verwendet (Dürig et al. 2007). Tatsächlich war in Übereinstimmung mit den klinischen Daten eine durch die anti-Bcl-2 AODN induzierte Umverteilung der transplantierten CLL-Zellen aus dem Blut und der Milz in das Knochenmark der Empfängertiere festzustellen. Im Zusammenhang mit den Microarraydaten und den Adhäsionsexperimenten im CLL-Stromazell-Kokultursystem sprechen diese Ergebnisse für einen Redistributionseffekt als wichtigste Erklärung für die klinisch beobachtete Abnahme der Tumorzelllast im peripheren Blut nach parenteraler Applikation der anti-Bcl-2 AODN.

4.4 Ausblick

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, die hier beschriebenen TLR-9 vermittelten aktivierenden Effekte therapeutisch auszunutzen. Die durch SPC2996 induzierte Heraufregulation des auf der Oberfläche der CLL-Zellen typischerweise nur schwach exprimierten CD20-Moleküls könnte zum Beispiel in einer kombinierten Anwendung die klinisch bereits eindeutig nachgewiesene Wirkung des anti-CD20 Antikörpers Rituximab bei der CLL verstärken. Insgesamt muss die weitere klinische Entwicklung von Oblimersen und SPC2996 vor dem Hintergrund der hier diskutierten Ergebnisse und der besseren anti-Bcl-2-Wirksamkeit des „*small molecules*“ Obatoclax kritisch bewertet werden.

5 Zusammenfassung

Das antiapoptotische Protein „*B-cell-lymphoma 2*“ (Bcl-2) spielt eine bedeutende Rolle für das Überleben von Zellen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und könnte sich daher als Zielstruktur für die Entwicklung neuer Therapieansätze eignen. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe verschiedener präklinischer in vitro und vivo CLL-Modelle die pharmakologischen Effekte der anti-Bcl-2 Antisense Oligonukleotide (AODN) Oblimersen und SPC2996 unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen chemischen und räumlichen Struktur charakterisiert.

Unter Verwendung der MEC-1 Leukämiezelllinie konnte in vitro gezeigt werden, dass Oblimersen und SPC2996 ihre molekulare Zielstruktur Bcl-2 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene herunterregulieren können. Diese Ergebnisse konnten allerdings nicht auf primäre CLL-Zellen, bei denen weder eine Regulation von Bcl-2 noch eine Beeinflussung des Zellüberlebens nachgewiesen werden konnte, übertragen werden. Nach Aufnahme in das Zytoplasma war mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eine endosomale Anreicherung fluorchrommarkierter AODN zu beobachten. Über eine Aktivierung des endosomalen Toll-like-Rezeptor-9 (TLR-9) induzierten die AODN eine Reihe von Nebeneffekten in den CLL-Zellen. So konnte zum Beispiel neben der Ausschüttung der proinflammatorisch wirksamen Zytokine MIP-1 α und TNF- α eine Heraufregulation der membranständigen Aktivierungsmarker CD20 und CD40 und eine gesteigerte Adhäsion der CLL-Zellen an M2-10B4 Stromazellen nachgewiesen werden. Die vergleichende Analyse beider AODN ergab, dass SPC2996 eine stärkere Herunterregulation der Bcl-2 Zielstruktur und geringere TLR-9-vermittelte Nebeneffekte induzierte als Oblimersen. Da sich die Basensequenz der beiden AODN nur unwesentlich unterscheidet, ist das pharmakologisch günstigere Wirkprofil von SPC2996 wahrscheinlich auf die LNA-Modifikation zurückzuführen. Im CLL NOD/SCID („*Non-obese diabetic/Severe combined immune deficiency*“) Xenograft-Modell war in Übereinstimmung mit den klinischen Phase-1 Ergebnissen von SPC2996 eine AODN-induzierte Umverteilung der transplantierten leukämischen Zellen aus dem Blut und der Milz in das Knochenmark der Empfängertiere zu beobachten.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, J. E. Heuser, X. Wang and C. W. Akey (2002): Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.* 9, 423-32.
- 2 Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R. M. Vabulas and H. Wagner (2002): Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol.* 32, 1958-68.
- 3 Basham, B., G. P. Schroth and P. S. Ho (1995): An A-DNA triplet code: thermodynamic rules for predicting A- and B-DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 6464-8.
- 4 Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409, 363-6.
- 5 Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguet, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbes and F. Gremy (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer.* 48, 198-206.
- 6 Bird, A. P. (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 321, 209-13.
- 7 Boice, J. D., Jr. and J. H. Lubin (1997): Occupational and environmental radiation and cancer. *Cancer Causes Control.* 8, 309-22.
- 8 Brameld, K. A. and W. A. Goddard (1999): Ab Initio Quantum Mechanical Study of the Structures and Energies for the Pseudorotation of 5'-Dehydroxy Analogues of 2'-Deoxyribose and Ribose Sugars. *Journal of the American Chemical Society.* 121, 985-993.
- 9 Brown, D. A., S. H. Kang, S. M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu and M. I. Nerenberg (1994): Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. *J Biol Chem.* 269, 26801-5.
- 10 Capaccioli, S., G. Di Pasquale, E. Mini, T. Mazzei and A. Quattrone (1993): Cationic lipids improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum. *Biochem Biophys Res Commun.* 197, 818-25.

- 11 Chapados, B. R., Q. Chai, D. J. Hosfield, J. Qiu, B. Shen and J. A. Tainer (2001): Structural biochemistry of a type 2 RNase H: RNA primer recognition and removal during DNA replication. *J Mol Biol.* 307, 541-56.
- 12 Cheson, B. D., J. M. Bennett, M. Grever, N. Kay, M. J. Keating, S. O'Brien and K. R. Rai (1996): National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 87, 4990-7.
- 13 Chiorazzi, N., K. R. Rai and M. Ferrarini (2005): Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 352, 804-15.
- 14 Crooke, S. T. (1999): Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta.* 1489, 31-44.
- 15 Custer, R. P., G. C. Bosma and M. J. Bosma (1985): Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am J Pathol.* 120, 464-77.
- 16 Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini and N. Chiorazzi (1999): Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94, 1840-7.
- 17 Decker, T., F. Schneller, T. Sparwasser, T. Tretter, G. B. Lipford, H. Wagner and C. Peschel (2000): Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood.* 95, 999-1006.
- 18 Dighiero, G. and J. L. Binet (2000): When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343, 1799-801.
- 19 Döhner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Döhner, M. Bentz and P. Lichter (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 343, 1910-6.
- 20 Dreger, P., P. Corradini, E. Kimby, M. Michallet, D. Milligan, J. Schetelig, W. Wiktor-Jedrzejczak, D. Niederwieser, M. Hallek and E. Montserrat (2007): Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia.* 21, 12-7.
- 21 Dürig, J., U. Dührsen, L. Klein-Hitpass, J. Worm, J. B. Hansen, H. Ørum and M. Wissenbach (2011): The novel antisense Bcl-2 inhibitor SPC2996 causes rapid leukemic cell clearance and immune activation in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 25, 638-47.
- 22 Dürig, J., P. Ebeling, F. Grabellus, U. R. Sorg, M. Möllmann, P. Schutt, J. Göthert, L. Sellmann, S. Seeber, M. Flasshove, U. Dührsen and T. Moritz (2007): A novel nonobese diabetic/severe combined immunodeficient

- xenograft model for chronic lymphocytic leukemia reflects important clinical characteristics of the disease. *Cancer Res.* 67, 8653-61.
- 23 Dürig, J., N. G. Testa and C. M. Heyworth (1999): Distinct biological effects of macrophage inflammatory protein-1alpha and stroma-derived factor-1alpha on CD34+ hemopoietic cells. *Stem Cells.* 17, 62-71.
- 24 Edelmann, J., L. Klein-Hitpass, A. Carpinteiro, A. Führer, L. Sellmann, S. Stilgenbauer, U. Dührsen and J. Dürig (2008): Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leuk Res.* 32, 1565-72.
- 25 Efremov, D. G., A. Wiestner and L. Laurenti (2012): Novel Agents and Emerging Strategies for Targeting the B-Cell Receptor Pathway in CLL. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 4, e2012067.
- 26 Franklin, R. E. and R. G. Gosling (1953): Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature.* 172, 156-7.
- 27 Guinness, M. E., J. L. Kenney, M. Reiss and J. Lacy (2000): Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide therapy of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 60, 5354-8.
- 28 Haas, T., J. Metzger, F. Schmitz, A. Heit, T. Muller, E. Latz and H. Wagner (2008): The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity.* 28, 315-23.
- 29 Hallek, M. (2009): State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 440-9.
- 30 Hallek, M., B. D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Döhner, P. Hillmen, M. J. Keating, E. Montserrat, K. R. Rai and T. J. Kipps (2008): Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood.* 111, 5446-56.
- 31 Hamblin, T. J., Z. Davis, A. Gardiner, D. G. Oscier and F. K. Stevenson (1999): Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 94, 1848-54.
- 32 Hanada, M., D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer and J. C. Reed (1993): bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 82, 1820-8.
- 33 Hannon, G. J. (2002): RNA interference. *Nature.* 418, 244-51.
- 34 Hartmann, G. and A. M. Krieg (2000): Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol.* 164, 944-53.

- 35 Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 408, 740-5.
- 36 Hockenbery, D., G. Nunez, C. Millman, R. D. Schreiber and S. J. Korsmeyer (1990): Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 348, 334-6.
- 37 Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdörfer, T. Giese, S. Endres and G. Hartmann (2002): Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 168, 4531-7.
- 38 Huang, D. C., J. M. Adams and S. Cory (1998): The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J*. 17, 1029-39.
- 39 Ibrahim, S., M. Keating, K. A. Do, S. O'Brien, Y. O. Huh, I. Jilani, S. Lerner, H. M. Kantarjian and M. Albitar (2001): CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 98, 181-6.
- 40 Jahrsdörfer, B., G. Hartmann, E. Racila, W. Jackson, L. Muhlenhoff, G. Meinhardt, S. Endres, B. K. Link, A. M. Krieg and G. J. Weiner (2001): CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leukoc Biol*. 69, 81-8.
- 41 Jahrsdörfer, B., R. Jox, L. Muhlenhoff, K. Tschoep, A. Krug, S. Rothenfusser, G. Meinhardt, B. Emmerich, S. Endres and G. Hartmann (2002): Modulation of malignant B cell activation and apoptosis by bcl-2 antisense ODN and immunostimulatory CpG ODN. *J Leukoc Biol*. 72, 83-92.
- 42 Johansson, P., L. Eisele, L. Klein-Hitpass, L. Sellmann, U. Dührsen, J. Dürig and H. Nüchel (2010): Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 34, 892-8.
- 43 Jürgensmeier, J. M., Z. Xie, Q. Deveraux, L. Ellerby, D. Bredesen and J. C. Reed (1998): Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95, 4997-5002.
- 44 Kawai, T. and S. Akira (2006): TLR signaling. *Cell Death Differ*. 13, 816-25.
- 45 Kitada, S., T. Miyashita, S. Tanaka and J. C. Reed (1993): Investigations of antisense oligonucleotides targeted against bcl-2 RNAs. *Antisense Res Dev*. 3, 157-69.
- 46 Klasa, R. J., A. M. Gillum, R. E. Klem and S. R. Frankel (2002): Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 12, 193-213.

-
- 47 Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*. 374, 546-9.
- 48 Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdörfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg and G. Hartmann (2001): Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*. 31, 2154-63.
- 49 Küppers, R. (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 5, 251-62.
- 50 Küppers, R., U. Klein, M. L. Hansmann and K. Rajewsky (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 341, 1520-9.
- 51 Kurreck, J., E. Wyszko, C. Gillen and V. A. Erdmann (2002): Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 30, 1911-8.
- 52 Laurenti, L., L. De Padua, G. D'Arena, B. Vannata, I. Innocenti, M. Tarnani, S. Deaglio, S. Sica, D. G. Efremov and G. Leone (2011): New and old monoclonal antibodies for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Mini Rev Med Chem*. 11, 508-18.
- 53 Lendvai, G., A. Monazzam, I. Velikyan, B. Eriksson, R. Josephsson, B. Langstrom, M. Bergstrom and S. Estrada (2009): Non-hybridization saturable mechanisms play a role in the uptake of (68)Ga-Labeled LNA-DNA mixmer antisense oligonucleotides in rats. *Oligonucleotides*. 19, 223-32.
- 54 Lin, T. S. (2010): New agents in chronic lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 5, 29-34.
- 55 Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 305, 1437-41.
- 56 Mansoor, M. and A. J. Melendez (2008): Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio*. 2, 275-95.
- 57 Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388, 394-7.
- 58 Mizuno, T., M. Y. Chou and M. Inouye (1984): A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81, 1966-70.

-
- 59 Molica, S. and D. Levato (2001): What is changing in the natural history of chronic lymphocytic leukemia? *Haematologica*. 86, 8-12.
- 60 Morton, L. M., S. S. Wang, S. S. Devesa, P. Hartge, D. D. Weisenburger and M. S. Linet (2006): Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 107, 265-76.
- 61 O'Brien, S., J. O. Moore, T. E. Boyd, L. M. Larratt, A. Skotnicki, B. Koziner, A. A. Chanan-Khan, J. F. Seymour, R. G. Bociek, S. Pavletic and K. R. Rai (2007): Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 25, 1114-20.
- 62 O'Brien, S., J. O. Moore, T. E. Boyd, L. M. Larratt, A. B. Skotnicki, B. Koziner, A. A. Chanan-Khan, J. F. Seymour, J. Gribben, L. M. Itri and K. R. Rai (2009): 5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen. *J Clin Oncol*. 27, 5208-12.
- 63 O'Brien, S. M., D. F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M. J. Keating, J. Viallet and B. D. Cheson (2009): Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 113, 299-305.
- 64 O'Brien, S. M., C. C. Cunningham, A. K. Golenkov, A. G. Turkina, S. C. Novick and K. R. Rai (2005): Phase I to II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 23, 7697-702.
- 65 Obika, S., Y. Hari, T. Sugimoto, M. Sekiguchi and T. Imanishi (2000): Triplex-forming enhancement with high sequence selectivity by single 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) modification. *Tetrahedron Letters*. 41, 8923-8927.
- 66 Obika, S., D. Nanbu, Y. Hari, J.-i. Andoh, K.-i. Morio, T. Doi and T. Imanishi (1998): Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed N-type conformation, 2'-O,4'-C-methyleneteribonucleosides. *Tetrahedron Letters*. 39, 5401-5404.
- 67 Obika, S., D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida and T. Imanishi (1997): Synthesis of 2'-O,4'-C-methylenauridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C3, -endo sugar puckering. *Tetrahedron Letters*. 38, 8735-8738.
- 68 Paterson, B. M., B. E. Roberts and E. L. Kuff (1977): Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74, 4370-4.

- 69 Pepper, C., A. Thomas, J. Hidalgo de Quintana, S. Davies, T. Hoy and P. Bentley (1999): Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia--the role of Bcl-2 family dysregulation. *Leuk Res.* 23, 1007-14.
- 70 Petersen, M., K. Bondensgaard, J. Wengel and J. P. Jacobsen (2002): Locked Nucleic Acid (LNA) Recognition of RNA:NMR Solution Structures of LNA:RNA Hybrids. *Journal of the American Chemical Society.* 124, 5974-5982.
- 71 Petersen, M., C. B. Nielsen, K. E. Nielsen, G. A. Jensen, K. Bondensgaard, S. K. Singh, V. K. Rajwanshi, A. A. Koshkin, B. M. Dahl, J. Wengel and J. P. Jacobsen (2000): The conformations of locked nucleic acids (LNA). *Journal of Molecular Recognition.* 13, 44-53.
- 72 Rai, K. R., A. Sawitsky, E. P. Cronkite, A. D. Chanana, R. N. Levy and B. S. Pasternack (1975): Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 46, 219-34.
- 73 Redaelli, A., B. L. Laskin, J. M. Stephens, M. F. Botteman and C. L. Pashos (2004): The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *Eur J Cancer Care (Engl).* 13, 279-87.
- 74 Seifert, M., L. Sellmann, J. Bloehdorn, F. Wein, S. Stilgenbauer, J. Dürig and R. Küppers (2012): Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med.* 209, 2183-98.
- 75 Shanafelt, T. D., G. Jenkins, T. G. Call, C. S. Zent, S. Slager, D. A. Bowen, S. Schwager, C. A. Hanson, D. F. Jelinek and N. E. Kay (2009): Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 115, 363-72.
- 76 Shoji, Y., S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman and R. L. Juliano (1991): Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages. *Nucleic Acids Res.* 19, 5543-50.
- 77 Singh, S. K., R. Kumar and J. Wengel (1998): Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides. *J Org Chem.* 63, 6078-6079.
- 78 Stacchini, A., M. Aragno, A. Vallario, A. Alfarano, P. Circosta, D. Gottardi, A. Faldella, G. Rege-Cambrin, U. Thunberg, K. Nilsson and F. Caligaris-Cappio (1999): MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in prolymphocytoid transformation. *Leuk Res.* 23, 127-36.
- 79 Stein, C. A. and J. S. Cohen (1988): Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer Res.* 48, 2659-68.
- 80 Stein, C. A., J. B. Hansen, J. Lai, S. Wu, A. Voskresenskiy, A. Hog, J. Worm, M. Hedtjarn, N. Souleimanian, P. Miller, H. S. Soifer, D. Castanotto, L. Benimetskaya, H. Ørum and T. Koch (2009): Efficient gene silencing by

- delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.* 38, e3.
- 81 Stein, C. A., J. L. Tonkinson, L. M. Zhang, L. Yakubov, J. Gervasoni, R. Taub and S. A. Rotenberg (1993): Dynamics of the internalization of phosphodiester oligodeoxynucleotides in HL60 cells. *Biochemistry.* 32, 4855-61.
- 82 Stephenson, M. L. and P. C. Zamecnik (1978): Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75, 285-8.
- 83 Strasser, A., L. O'Connor and V. M. Dixit (2000): Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 69, 217-45.
- 84 Takeda, K. and S. Akira (2005): Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 17, 1-14.
- 85 Tsimberidou, A. M. and M. J. Keating (2010): Treatment of patients with fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: need for new treatment options. *Leuk Lymphoma.* 51, 1188-99.
- 86 Tsujimoto, Y. and C. M. Croce (1986): Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 5214-8.
- 87 Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell and C. M. Croce (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science.* 226, 1097-9.
- 88 Vollmer, J., J. S. Jepsen, E. Uhlmann, C. Schetter, M. Jurk, T. Wader, M. Wullner and A. M. Krieg (2004): Modulation of CpG oligodeoxynucleotide-mediated immune stimulation by locked nucleic acid (LNA). *Oligonucleotides.* 14, 23-31.
- 89 Waters, J. S., A. Webb, D. Cunningham, P. A. Clarke, F. Raynaud, F. di Stefano and F. E. Cotter (2000): Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 18, 1812-23.
- 90 Watson, J. D. and F. H. Crick (1953): Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 171, 737-8.
- 91 White, A. P., K. K. Reeves, E. Snyder, J. Farrell, J. W. Powell, V. Mohan and R. H. Griffey (1996): Hydration of single-stranded phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 24, 3261-6.
- 92 Wiestner, A. (2012): Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 120, 4684-91.

- 93 Wiestner, A., A. Rosenwald, T. S. Barry, G. Wright, R. E. Davis, S. E. Henrickson, H. Zhao, R. E. Ibbotson, J. A. Orchard, Z. Davis, M. Stetler-Stevenson, M. Raffeld, D. C. Arthur, G. E. Marti, W. H. Wilson, T. J. Hamblin, D. G. Oscier and L. M. Staudt (2003): ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 101, 4944-51.
- 94 Willis, S. N. and J. M. Adams (2005): Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 17, 617-25.
- 95 Wu, H., W. F. Lima, H. Zhang, A. Fan, H. Sun and S. T. Crooke (2004): Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem*. 279, 17181-9.
- 96 Yin, X. M., Z. N. Oltvai and S. J. Korsmeyer (1994): BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*. 369, 321-3.
- 97 Zenz, T., D. Mertens, R. Küppers, H. Döhner and S. Stilgenbauer (2010): From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 10, 37-50.
- 98 Zhang, Y., Z. Qu, S. Kim, V. Shi, B. Liao, P. Kraft, R. Bandaru, Y. Wu, L. M. Greenberger and I. D. Horak (2010): Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection. *Gene Ther*. 18, 326-33.

7 Anhang

7.1 Übersicht über die verwendeten Patientenproben

Risikofaktoren (Binet-Stadium, CD38-Status, ZAP70-Status, FISH) innerhalb der Patientenproben sowie die Verwendung für einzelne Experimente

Tabelle 14: Liste der verwendeten Patientenproben

Nr.	Patientenproben verwendet im Experiment								Risikofaktoren			
	Viabilität	FACS CD20/CD40	ELISA	Ad-häsion	NOD/SCID Experiment	West. Blot	PCR	Mikroskop	Binet-Stadium	CD38 >30%	ZAP70 [%]	FISH
1	+	+				+			C	0	21	Trisomie 12, del 13q14
2		+	+	+					A	+	k.A.	del11q
3		+	+			+			A	+	25	del 13q
4								+	A	0	2	del 13q14 interstitiell
5	+	+							B	k.A.	k.A.	Trisomie 12
6	+	+					+		B	0		del 11q22-23q, del 13q14
7	+								k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
8	+	+	+			+			B	0	k.A.	del13q14
9			+						k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
10		+	+			+			A	1	k.A.	unauffällig
11							+		k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
12	+	+				+			C	0	k.A.	del 13q14
13	+	+	+	+		+			A	0	k.A.	del 13q14 interstitiell
14	+	+	+			+	+	+	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
15	+								A	1	k.A.	Trisomie 12
16					+				k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
17			+				+		A	0	20	del 13q14
18	+		+	+		+	+		A	0	k.A.	del13q14 interstitiell
19			+						C	0	6	del 13q14 interstitiell
20	+					+			C	0	0	del11q
21	+	+							A	k.A.	k.A.	Trisomie 12
22							+		k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
23		+	+			+			C	0	37	del 13q14 interstitiell
24	+					+			A	0	k.A.	unauffällig
25			+	+			+		A	0	k.A.	del13q14
26	+	+	+						C	0	k.A.	del 13q14 interstitiell
27								+	A	0	k.A.	del 13q14
28			+						k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
29			+						A	1	k.A.	unauffällig
30	+								C	1	k.A.	del 11q22.3
31				+					k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
32	+								C	0	k.A.	del13q14

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der intrinsische Weg der Apoptose	15
Abbildung 2: Wege eines AODN in einer Zelle.....	21
Abbildung 3: Modifikationen von AODN	22
Abbildung 4: LNA-modifiziertes AODN in der Haworth-Formel	23
Abbildung 5: Zuckerteil eines LNA-Oligonukleotids in der Sessel-Konfiguration ..	24
Abbildung 6: FSC/SSC Punkte-Darstellung der Signale von humanen Blutzellen	47
Abbildung 7: Bcl-2 mRNA Expression in der Zelllinie MEC-1	53
Abbildung 8: Bcl-2 mRNA Expression in CLL-Zellen.....	54
Abbildung 9: Bcl-2 Proteinexpression in der Zelllinie MEC-1	55
Abbildung 10: Bcl-2 Proteinexpression in CLL-Zellen	55
Abbildung 11: Aufnahme von SPC2996FAM in eine CLL-Zelle mittels Gymnosis	56
Abbildung 12: Leicht erhöhte Apoptoserate in MEC-1 Zellen.....	57
Abbildung 13: Apoptose in CLL-Zellen	57
Abbildung 14: Viabilität der MEC-1 Zelllinie.....	58
Abbildung 15: Viabilität der CLL-Zellen	58
Abbildung 16: Additiver Effekt von Fludarabin mit AODN.....	59
Abbildung 17: MIP-1 α -Ausschüttung von CLL-Zellen nach Inkubation mit AODN	61
Abbildung 18: TNF- α -Ausschüttung von CLL-Zellen nach Inkubation mit AODN .	61
Abbildung 19: CD20 Expression auf CLL-Zellen	63
Abbildung 20: CD40 Expression auf CLL-Zellen	64
Abbildung 21: Kombination von Oligonukleotiden mit Rituximab.....	65
Abbildung 22: Adhäsion von CLL-Zellen an einer M2-10B4 Stroma-Zellschicht ..	66
Abbildung 23 A - C: Verteilung humaner Zellen in verschiedenen Kompartimenten der Maus	68
Abbildung 24: Der Toll-like-Rezeptor-9-Signalweg	71

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Rai	10
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach Binet	10
Tabelle 3: Möglichkeiten der Modifikation von AODN	20
Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.....	25
Tabelle 5: Liste der verwendeten Geräte	28
Tabelle 6: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	29

Tabelle 7: Liste der verwendeten chemischen Substanzen	30
Tabelle 8: Liste der verwendeten Lösungen und Puffer	32
Tabelle 9: Liste der verwendeten Antikörper für Durchflusszytometrie.....	33
Tabelle 10: Liste der verwendeten Antikörper für Western Blot.....	33
Tabelle 11: Liste der verwendeten Antisense-Oligonukleotide	34
Tabelle 12: Liste der verwendeten Kits	34
Tabelle 13: Liste der verwendeten Medien.....	34
Tabelle 14: Liste der verwendeten Patientenproben	85

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AODN	Antisense-Oligonukleotide
AP-1	Activating protein-1
Apaf-1	Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1
APC	Allophycocyanin
Bad	Bcl-2 associated death promoter
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCA	Bicinchonic acid
Bcl-2	B cell lymphoma 2
Bcl-XL	B cell lymphoma extra-large
BH	Bcl-2 homologe
Bik	Bcl-2 interacting killer
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Copy DNA
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
CpG	Cytosin-phosphat-Guanin
Ct	Cycle threshold
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie

DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP's	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphate
ECL	Enzymatische Chemolumineszenz-Lösungen
ELISA	Enzyme-linked immunoabsorbant assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCM	Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron
FCR	Fludarabin, Cyclophosphamid, Rituximab
FCS	Foetal calf serum
FET	Fluoreszenzenergietransfer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HRP	Horseradish peroxidase
IFZ	Institut für Zellbiologie
IgVH	Immunoglobulin heavy chain variable region
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
KG	Körpergewicht
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
LNA	Locked nucleic acid
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MIP1-α	Macrophage inflammatory protein 1- α
miRNA	Micro RNA
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response protein 88
NCI	National cancer institute
NF-κB	Nuclear factor- κ B
NOD/SCID	Non-obese diabetic/Severe combined immune deficiency
PBS	Phosphat buffered saline
PC5	Peridinin-Chlorophyll-Protein Cyanin 5
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
piRNA	Piwi-interacting RNA

PVDF	Polyvinylidendifluorid
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Real time PCR
SD	Standard deviation
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	Small interfering RNA
SPC	Santaris Pharma Compound
SSC	Sideward scatter
TLR-9	Toll-like-Rezeptor-9
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
UV/VIS	Ultraviolett/Visible
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

Hinweis: Übersicht über alle im Text der Arbeit verwendeten Abkürzungen. In Tabellen und Grafiken verwendete Abkürzungen, allgemein gebräuchliche Abkürzungen und Markennamen sind nicht gesondert gelistet.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei dem Direktor der Klinik für Hämatologie, Prof. Dr. Ulrich Dührsen, für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit zur Promotion bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. Jan Dürig für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die gute Betreuung dieser Arbeit, die stetige Bereitschaft zu anregenden Diskussionen, und für die Möglichkeit zur Präsentation meiner Arbeit auf dem DGHO-Kongress 2010.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Priv.-Doz. Dr. Ludger Klein-Hitpass für die Durchführung der *real time* PCR-Analysen, bei Dr. Lewin Eisele für viele gute Hinweise zur statistischen Auswertung, und bei Dr. Ludger Sellmann für die Hilfe bei der Arbeit am Fluoreszenzmikroskop.

Ganz herzlich möchte ich mich bei dem Team der experimentellen Hämatologie in der IG1 bedanken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden.

9 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.